



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



### ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

**Συμπλήρωμα διατροφής με βάση το βιολογικό έξτρα παρθένο ελαιόλαδο  
υψηλής συγκέντρωσης πολυφαινολών και χρήση μεθόδων  
νανοτεχνολογίας**

---

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Β', ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**ΔΕΜΙΣΛΗ ΣΩΤΗΡΙΑ  
Α.Μ. 00027  
ΑΘΗΝΑ, 2018**



UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION  
INSTITUTE OF BIOLOGY, MEDICINAL CHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES  
IN  
BIOENTREPRENEURSHIP**



**MASTER THESIS**

---

**Food supplement based on high-phenolic extra virgin olive oil using  
nanotechnology**

---

**SUPERVISOR: RESEARCHER B', PAPADIMITRIOU VASSILIKI**

**DEMISLI SOTIRIA  
A.M. 00027  
ATHENS, 2018**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

## **ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ**

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Εγκρίθηκε την ..... από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

<b>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ</b>	<b>ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
Παπαδημητρίου Βασιλική	Ερευνήτρια Β'	
Ξενάκης Αριστοτέλης	Ερευνητής Α'	
Στάγκος Δημήτριος	Επίκουρος Καθηγητής	

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής της Διπλωματικής Εργασίας μου, την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Δρ. Βασιλική Παπαδημητρίου, Ερευνήτρια Γ', τον Δρ. Αριστοτέλη Ξενάκη, Διευθυντή Ερευνών και τον κύριο Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στην Δρ. Βασιλική Παπαδημητρίου και τον Δρ. Αριστοτέλη Ξενάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν στην εκπόνηση της εργασίας και για την υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου προσέφεραν σε κάθε βήμα, τόσο κατά την διάρκεια των πειραμάτων, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της ομάδας Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας για την συνεργασία τους σε καθημερινή βάση, ιδιαιτέρως την Υποψήφια Διδάκτορα Ιωάννα Θεοχάρη για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια που μου προσέφερε στο εργαστήριο, όπως επίσης και στην συγγραφή της εργασίας. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Υποψήφια Διδάκτωρα Ευγενία Μήτσου και την Δρ. Μαρία Χατζηδάκη για τον χρόνο και την προσοχή τους, καθώς και για την υποστήριξη και τις γνώσεις τους οι οποίες με βοήθησαν να ανταπεξέλθω στις δυσκολίες που συνάντησα.

Αφιερωμένη στους γονείς μου,  
που είναι πάντα δίπλα μου και με υποστηρίζουν σε κάθε βήμα μου

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες .....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ΣΚΟΠΟΣ .....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
2. Ο ΚΛΑΔΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ .....	10
2.1 Τα συμπληρώματα διατροφής ως απαραίτητο τμήμα της διατροφής.....	12
2.2 Ο ρόλος της Βιταμίνης D στον οργανισμό.....	14
2.3 Η αγορά των συμπληρωμάτων διατροφής.....	16
2.3.1 Συμπληρώματα Βιταμίνης D στην Ελλάδα.....	18
3. ΝΑΝΟΔΙΑΣΠΟΡΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ .....	19
3.1 Συστήματα ενθυλάκωσης (μικρο-/νανο-γαλακτώματα) και χαρακτηριστικά .....	20
3.2 Χρησιμότητα ενθυλάκωσης και ενθυλάκωση θρεπτικών συστατικών σε νανοσυστήματα .....	23
3.3 Νανογαλακτώματα: παρασκευή και ιδιότητες.....	25
3.4 Επιλογή συστατικών νανογαλακτωμάτων .....	27
3.4.1 Έλαιο: Myrtilion ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών ...	28
3.4.2 Επιφανειοενεργές ουσίες: Λεκιθίνη και Tween 20 .....	30
3.4.3 Υδατική φάση: υδατικό διάλυμα κιτρικού ασβεστίου.....	33
3.4.4 Βιοδραστική ουσία προς ενθυλάκωση: Βιταμίνη D3.....	35
3.5 Εφαρμογές νανογαλακτωμάτων .....	36
4. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ .....	38
4.1 Υλικά .....	38
4.2 Μέθοδοι.....	38
4.2.1 Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (High Pressure Homogenization-HPH) .....	39
4.2.2 Παρασκευή νανογαλακτωμάτων .....	40
4.2.2.1 Ενθυλάκωση βιταμίνης D.....	42
4.2.2.2 Προσθήκη ασβεστίου.....	42
4.2.3 Δομική μελέτη.....	43
4.2.3.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering- DLS).....	43
4.2.3.2 Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electronic Paramagnetic Resonance Spectroscopy- EPR) .....	43
4.2.4 Αντιοξειδωτική μελέτη .....	45
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
5.1 Δομική μελέτη νανογαλακτώματος.....	46
5.1.1 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).....	46
5.1.2 Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)- Δομή (ή Δυναμική) Μembrάνης.....	48
5.2 Αντιοξειδωτική μελέτη EPR.....	50

6. ΧΡΗΜΑΤΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟ ΠΛΑΝΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ .....	53
6.1 Παραγωγή του προϊόντος.....	54
6.1.1 Εξοπλισμός .....	54
6.1.2 Πρώτες ύλες.....	55
6.1.3 Ανθρώπινο δυναμικό .....	55
6.1.4 Λειτουργικά κόστη.....	56
6.1.5 Κεφάλαιο κίνησης .....	56
6.2 Ανταγωνισμός.....	57
6.3 Σχέδιο Marketing .....	57
6.4 Προβλεπόμενα έσοδα .....	60
6.5 Ανάλυση SWOT.....	61
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....	70
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Πίνακες.....	70
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ- Κόστη εξοπλισμού και Λειτουργικά έξοδα.....	76
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ- Δάνεια.....	76
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV- Κεφάλαιο κίνησης και Έσοδα.....	77
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V- Ταμειακές ροές .....	78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI- Λογαριασμοί εκμετάλλευσης.....	78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII- Ανάλυση νεκρού σημείου.....	79

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη αφορά την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος με χρήση μεθόδων νανοτεχνολογίας, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής. Η μεθοδολογία αυτή επιλέχθηκε, προκειμένου να προστατευθεί η βιοδραστική ουσία από τις περιεχόμενες στο λάδι πολυφαινόλες και τα λοιπά συστατικά του προϊόντος και να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητά της στον οργανισμό. Αναπτύχθηκαν νανογαλακτώματα τύπου έλαιο-σε-νερό (O/W) στα οποία πραγματοποιήθηκε ενθυλάκωση βιταμίνης D3 (χοληκαλσιφερόλη) που είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία όλων των οργανισμών, αλλά κυρίως ενισχύει την πυκνότητα των οστών σε άτομα τρίτης ηλικίας. Οι νανοδιασπορές παρασκευάστηκαν με χρήση εδωδιμων επιφανειοενεργών που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και ως εκ τούτου είναι ασφαλείς, μη τοξικές και βιοαποικοδομήσιμες.

Τα νανογαλακτώματα O/W ορίζονται ως κολλοειδείς διασπορές αποτελούμενες από δύο μη αναμίξιμα υγρά εκ των οποίων το έλαιο βρίσκεται διεσπαρμένο με τη μορφή μικρών σταγονιδίων ( $r < 400$  nm) στην υδατική φάση και σταθεροποιούνται από μονοστιβάδα επιφανειοενεργών. Αρχικά, οι νανοδιασπορές παρασκευάστηκαν και σταθεροποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή υψηλής πίεσης και ακολούθως, πραγματοποιήθηκε δομική μελέτη των νανο-σταγονιδίων στο χρόνο με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering- DLS), παρουσία και απουσία βιοδραστικής ουσίας, δίνοντάς μας πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος της διεσπαρμένης φάσης (νανοσταγονίδια ελαιολάδου) καθώς και την ομοιογένεια και την σταθερότητα του συστήματος. Στη συνέχεια διενεργήθηκε αντιοξειδωτική μελέτη των νανογαλακτωμάτων και μελετήθηκαν οι ιδιότητες της μονοστιβάδας των επιφανειοενεργών με φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electronic Paramagnetic Resonance- EPR) με σκοπό να υπολογιστούν ο χρόνος ιδιοπεριστροφής ( $\tau_R$ ) του ιχνηθέτη spin 5-DSA και η παράμετρος S, που είναι ενδεικτική της ρευστότητας της μεσεπιφάνειας, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση που έχει η σύσταση των νανογαλακτωμάτων και η παρουσία της βιταμίνης στη δυναμική της μεσεπιφάνειας.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έρευνα και μελέτη των υπαρχόντων συμπληρωμάτων διατροφής που περιέχουν βιταμίνη D3 κυρίως στην ελληνική αγορά και διενεργήθηκε μία προμελέτη σκοπιμότητας, ώστε να προσδιοριστεί το κατά πόσο



είναι εφικτό και αναγκαίο να εισαχθεί το συγκεκριμένο προϊόν που αναπτύχθηκε στις αγορές.

**ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:** Νανογαλακτώματα, Έλαιο-σε-νερό, Ελαιόλαδο, Βιταμίνη D3, Συμπλήρωμα διατροφής

## ΣΚΟΠΟΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έχει ως σκοπό την ανάπτυξη νανοδιασπορών προκειμένου να πραγματοποιηθεί εγκλωβισμός βιταμίνης D3 σε ελαιόλαδο, με στόχο να χρησιμοποιηθούν ως συμπλήρωμα διατροφής. Η βιταμίνη αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ορθή λειτουργία του οργανισμού, καθώς συμμετέχει σε βασικές λειτουργίες του. Ωστόσο, λόγω του ότι παράγεται από τον οργανισμό μετά από έκθεση στον ήλιο, συχνά παρατηρείται έλλειψή της ιδιαίτερα στα άτομα τρίτης ηλικίας, προκαλώντας ποικίλα προβλήματα υγείας με αποτέλεσμα να αναγκάζονται να στραφούν σε συμπληρώματα διατροφής. Επιπλέον η βιταμίνη D βοηθά την ενεργή απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο συμβάλλοντας στην πρόληψη της οστεοπόρωσης. Συνεπώς, τα νανογλακτώματα που παρασκευάστηκαν έχουν ως στόχο να καλύψουν ταυτόχρονα την ανάγκη τόσο για την ζητούμενη βιταμίνη, όσο και για το ασβέστιο, τα οποία σε συνδυασμό με το ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων, συνθέτουν ένα νέο προϊόν βασισμένο σε φυσικές πρώτες ύλες.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Νανοτεχνολογία, ορίζεται κυρίως ως ο κλάδος της επιστήμης που ασχολείται με την ανάπτυξη, μελέτη και χρήση λειτουργικών δομών που περιλαμβάνουν σωματίδια μεγέθους έως 200-500nm. Το μέγεθος των σωματιδίων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη βιβλιογραφική αναφορά (National Nanotechnology Initiative) (Roco, 2007). Η ανάπτυξή της επέφερε σημαντικές εξελίξεις σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας όπως τα φάρμακα, τα τρόφιμα, τα καλλυντικά και τα αγροχημικά.

Η πρώτη αναφορά χρήσης μεθόδων νανοτεχνολογίας στον φαρμακευτικό κλάδο έγινε το 1960 με την ανάπτυξη λιποσωμάτων που αποτέλεσαν τα πρώτα συστήματα μεταφοράς για τη χορήγηση φαρμάκων (Bangham, Standish, & Watkins, 1965) και στη συνέχεια αναπτύχθηκε το πρώτο σύστημα πολυμερών για ελεγχόμενη αποδέσμευση το 1976 (Langer & Folkman, 1976). Έκτοτε, οι εξελίξεις ήταν ραγδαίες και από το 1980 και μετά άρχισε η ανάπτυξη πιο περίπλοκων συστημάτων τα οποία βασίζονταν στην ανταπόκριση στις αλλαγές του pH για την αποδέσμευση της βιοδραστικής ουσίας (Yatvin, Kreutz, Horwitz, & Shinitzky, 1980) , στόχευαν συγκεκριμένα κύτταρα (Heath, Fraley, & Papahadjopoulos, 1980) ή είχαν διάφορες άλλες ιδιότητες. Στις μέρες μας, υπάρχει πληθώρα φαρμακευτικών προϊόντων τα οποία βασίζονται στην νανοτεχνολογία και το μέλλον προβλέπεται πολλά υποσχόμενο.

Ένας από τους πιο διαδεδομένους τρόπους χορήγησης φαρμάκων, είναι μέσω της λήψης από του στόματος λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρει, όπως η ευκολία στη λήψη, το ότι είναι οικονομικός και μη επεμβατικός. Ωστόσο, αυτή η οδός χορήγησης παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα και περιορισμούς οι οποίοι πρέπει να αντιμετωπιστούν. Σοβαρά προβλήματα παρουσιάζονται κατά την χορήγηση από του στόματος ουσιών με μικρή υδατική διαλυτότητα, κυρίως όσον αφορά τη σταθερότητά τους στην γαστρεντερική οδό και την μειωμένη τους ικανότητα να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες (Ravi & Padma, 2011). Στα προβλήματα αυτά, έρχονται οι μέθοδοι της νανοτεχνολογίας να δώσουν λύση. Συγκεκριμένα, οι νανοδιασπορές, με τις οποίες ασχολούμαστε στην παρούσα εργασία, προσφέρουν ποικίλα οφέλη, καθώς το μικρό μέγεθος των σταγόνων οι οποίες εμπεριέχουν τις βιοδραστικές ουσίες στα συστήματα αυτά, σχετίζεται με την αυξημένη απορρόφησή τους στην γαστρεντερική οδό σε σχέση με τα συμβατικά σκευάσματα (Ravi & Padma, 2011). Επίσης,

αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα της βιοδραστικής ουσίας, παρέχεται προστασία έναντι της υποβάθμισης/αποικοδόμησής της στη γαστρεντερική οδό, παρατείνεται ο χρόνος δράσης του και δίνεται η δυνατότητα για πιο ελεγχόμενη απορρόφηση. Επιπλέον, παρέχουν λύση για την χορήγηση μη υδατοδιαλυτών ουσιών.

Για πολλά χρόνια, η νανοτεχνολογία χρησιμοποιήθηκε για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας ήδη υπαρχόντων φαρμάκων και πλέον το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την σύνθεση νέων φαρμακευτικών προϊόντων αλλά και προς την επανεξέταση βιοδραστικών ουσιών που δεν είχαν αποδειχτεί ιδιαίτερα δραστικές στο παρελθόν (Heath et al., 1980). Χάρη σε αυτή, οι θεραπευτικές μέθοδοι προχωρούν και υλοποιούνται γρήγορα για την επίλυση διαφόρων περιορισμών των συμβατικών συστημάτων χορήγησης φαρμάκων όπως η μη ειδική βιοκατανομή και στόχευση, η έλλειψη υδατοδιαλυτότητας, η μικρή βιοδιαθεσιμότητα όταν λαμβάνονται από το στόμα και οι χαμηλοί θεραπευτικοί δείκτες (Ravi & Padma, 2011). Υπάρχει ποικιλία νανοδομών οι οποίες βρίσκονται από στερεή, ως υγρή μορφή όπως, οι νανοδιασπορές που περιλαμβάνουν τα μικρο- και νανο-γαλακτώματα, τα λιποσώματα, τα δενδριμερή, οι νανοσωλήνες και άλλα (Cho, Wang, Nie, Chen, & Shin, 2008).

Στις μέρες μας, ένας σημαντικός στόχος της βιομηχανίας των φαρμάκων είναι η αντιμετώπιση της ανεπάρκειας της Βιταμίνης D, που αποτελεί μείζον πρόβλημα του παγκόσμιου πληθυσμού, ακόμα και στην Ελλάδα που είναι μία ιδιαίτερα ηλιόλουστη χώρα. Ο λόγος που είναι απαραίτητη η αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού είναι, η συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ της ανεπάρκειας της Βιταμίνης D και τον αυξημένο κίνδυνο διάφορων σκελετικών και μη παθήσεων όπως η οστεοπόρωση, η ραχίτιδα, διάφοροι τύποι καρκίνου, ο διαβήτης τύπου 1, η υπέρταση, διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα κ.α. (Micheal F Holick & Chen, 2008).

Έχοντας υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το ενδιαφέρον της βιομηχανίας των φαρμάκων είναι στραμμένο προς την ανάπτυξη κολλοειδών συστημάτων για ενθυλάκωση βιοδραστικών ουσιών, πήρα την απόφαση να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα κατά τη διπλωματική μου εργασία, επιχειρώντας να προσφέρω λύση στα προβλήματα των υπαρχόντων σκευασμάτων. Υπάρχουν στην αγορά, πολυβιταμίνες που περιέχουν 400 IU βιταμίνης D και συμπληρώματα που περιέχουν μόνο βιταμίνη D σε διάφορες ποσότητες συμπεριλαμβανομένων 400, 1000, 2000, 4000, 5000 και 50 000 IU βιταμίνης D3, όλα τους όμως μειονεκτούν, το καθένα σε διαφορετικό σημείο. Παρόλο που οι

κατευθυντήριες γραμμές είναι το Ασβέστιο και Βιταμίνη D να λαμβάνονται παράλληλα και συμπληρωματικά, δεν διατίθενται συμπληρώματα διατροφής που να εμπεριέχουν και τα δύο στις συνιστώμενες ημερήσιες δόσεις. Επιπλέον, καθώς η Βιταμίνη D δεν είναι υδατοδιαλυτή, υπάρχει η πιθανότητα τα σκευάσματα αυτά να διαθέτουν μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση και να υπόκεινται σε υποβάθμιση στην γαστρεντερική οδό.

Στόχος λοιπόν της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι η ανάπτυξη βιοσυμβατών κολλοειδών συστημάτων, βασισμένων στο βιολογικό έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, για την ενθυλάκωση της Βιταμίνης D, τα οποία θα περιέχουν και Ασβέστιο στην υδατική τους φάση, παρέχοντας ταυτόχρονα και τα δύο συστατικά στην συνιστώμενη ημερήσια δόση, καλύπτοντας έτσι τις ανάγκες του οργανισμού. Τα κολλοειδή συστήματα διασποράς τύπου γαλακτώματος γενικά αποτελούνται από μία διεσπαρμένη υγρή φάση αποτελούμενη από μικρές σταγόνες, μέσα σε ένα μέσο διασποράς, τη συνεχή υγρή φάση (David Julian McClements, 2012) και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το μέγεθος των σταγόνων και τον τρόπο παρασκευής σε μικρο- και νανο- γαλακτώματα. Ανάλογα με το ποια φάση είναι η συνεχής και ποια η διεσπαρμένη, τα γαλακτώματα διακρίνονται σε ελαίου-σε-νερό και νερού-σε-έλαιο. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αναπτύχθηκαν νανογαλακτώματα τύπου έλαιο-σε-νερό, των οποίων η παρασκευή και μελέτη αλλά και οι ιδιότητες και εφαρμογές τους, θα αναλυθούν στα παρακάτω κεφάλαια.

## **2. Ο ΚΛΑΔΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Καθώς οι ανάγκες και οι απαιτήσεις του αγοραστικού κοινού μεταβάλλονται με τα χρόνια, ταυτόχρονα αλλάζουν και οι κατευθύνσεις στις οποίες κινείται η βιομηχανία των φαρμάκων. Στις μέρες μας, το ενδιαφέρον του καταναλωτή στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς έναν υγιεινό τρόπο ζωής και προς τα φυσικά προϊόντα. Έτσι λοιπόν, αναπτύχθηκε ο κλάδος των συμπληρωμάτων διατροφής, που έχουν ως στόχο την βελτίωση της ποιότητας ζωής των ανθρώπων με χρήση φυσικών βιοδραστικών ουσιών. Ένα ακόμα πλεονέκτημα του αναπτυσσόμενου αυτού κλάδου είναι, ότι τα σκευάσματα που περιλαμβάνονται σε αυτόν δεν απαιτούν πληθώρα κλινικών δοκιμών και πολύπλοκων εγκρίσεων, πριν την εισαγωγή τους στην αγορά, αφού τα συστατικά τους είναι βιοσυμβατά και συχνά ευρέως χρησιμοποιούμενα ακόμα και από τη βιομηχανία των τροφίμων.

Η χρήση φυτικών προϊόντων ως φάρμακα, προέρχεται από μία μακρά παράδοση όπου φυτά σε διάφορες μορφές χρησιμοποιούνταν για την βελτίωση και προώθηση της υγείας. Ήδη από την αρχαιότητα, τα φυτά ήταν στενά συνδεδεμένα με τη θεραπεία ασθενειών και το 1987, πραγματοποιήθηκε από τον Friedrich Bayer για πρώτη φορά, η σύνθεση του ακετυλο-σαλικυλικού οξέος (ασπιρίνη), φαρμάκου το οποίο ήταν βασισμένο στο φυσικό σαλικυλικό οξύ που παράγεται από τον φλοιό της ιτιάς. Τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, η βιομηχανία στράφηκε προς την παρασκευή συνθετικών φαρμάκων, αντικαθιστώντας τα παραγόμενα από φυτά προϊόντα με ουσίες που συχνά δεν είχαν καμία σύνδεση με αυτά ωστόσο, πολλά από τα φάρμακα, ακόμα περιέχουν φυτοχημικά η αξία των οποίων συνεχώς αυξάνεται. Σήμερα, τα φυτικά θεραπευτικά προϊόντα καταλαμβάνουν σχεδόν το 50% της αγοράς καθώς τα φυτά με τις βιοδραστικές τους ουσίες έχουν επιστρέψει στο προσκήνιο, αφού μέσω πληθώρας μελετών έχει αποδειχτεί ότι είναι βιολογικά ενεργά με αποτέλεσμα τον επαναπροσδιορισμό της σύνδεσης φυτικών προϊόντων και υγείας.

Ο ρόλος των φυτών είναι ιδιαίτερα σημαντικός στη φαρμακευτική βιομηχανία καθώς ανέκαθεν, αποτελούσαν σημαντική πηγή για την ανακάλυψη βιοδραστικών ουσιών με φαρμακολογικό ενδιαφέρον είτε άμεσα, είτε έμμεσα, με αποτέλεσμα αρκετά φάρμακα να προέρχονται από αυτά. Στη δεκαετία του 70, το 25% όλων των χορηγούμενων φαρμάκων στις ΗΠΑ, περιείχαν ενώσεις προερχόμενες από φυτά, ενώ το ποσοστό είναι ακόμα μεγαλύτερο παγκοσμίως (Cassileth, Heitzer, & Wesa, 2009). Οι βιοδραστικές ουσίες που ως τώρα έχουν βγει στην αγορά σε μορφή συμπληρωμάτων διατροφής, συμπεριλαμβάνουν βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, αντιοξειδωτικές ουσίες, ω-3 λιπαρά, προβιοτικά κ.α. Πρόσφατα, έχει αρχίσει η μελέτη όσον αφορά τον συνδυασμό διαφόρων ομάδων βιοδραστικών ουσιών ή τα φυσικά μίγματα αυτών, προκειμένου να ενισχυθεί η δράση τους μέσω συνεργιστικών φαινομένων ή να τους αποδοθούν νέες ιδιότητες (Shahidi, 2012), ωστόσο η έρευνα και η ανάπτυξη των βοτανικών προϊόντων επηρεάζεται έντονα από την αγορά για την οποία προορίζεται το προϊόν.

Παρά το γεγονός ότι τα συμπληρώματα διατροφής βασισμένα σε φυτικά προϊόντα έχουν κερδίσει σημαντικό μερίδιο της αγοράς, υπάρχουν ακόμα προβλήματα που περιορίζουν την αποτελεσματικότητά τους. Ένα από τα βασικά εμπόδια στη χρήση φυτικών παραγώγων από τη βιομηχανία φαρμάκων είναι η έλλειψη αναπαραγωγικότητας της δραστηριότητας έως και στο 40% των φυτικών εκχυλισμάτων (Cordell, 2000). Επίσης, οι δραστηριότητές τους μπορεί να διαφέρουν όταν αυτά χρησιμοποιηθούν ως συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων λόγω της

επεξεργασίας στην οποία υπόκεινται, σε αντίθεση με αυτήν που εμφανίζεται πειραματικά πριν την ενσωμάτωσή τους στο επιθυμητό σκεύασμα και επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των περιεχόμενων στα φυτά βιοδραστικών ουσιών, μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία, την εποχή της συγκομιδής, την τοποθεσία κλπ. Λόγω αυτών, αλλά και επειδή πολλές από τις βιοδραστικές ουσίες που είναι στο κέντρο του ενδιαφέροντος για χρήση στα συμπληρώματα διατροφής, είναι μη υδατοδιαλυτές, παρουσιάζονται προβλήματα όσον αφορά την απορρόφηση και την βιοδιαθεσιμότητα των επιθυμητών ουσιών.

Είναι ζωτικής σημασίας για την εξέλιξη του κλάδου αυτού, να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα, μέσω της ανάπτυξης νέων μεθόδων για την αποτελεσματική εξερεύνηση των βιοδραστικών ουσιών που έρχονται συνεχώς στο προσκήνιο και για την παρασκευή όλο και πιο αποτελεσματικών σκευασμάτων με αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα και δραστηριότητα, προκειμένου τα προϊόντα με φυτικές και όχι μόνο, βιοδραστικές ουσίες να γίνουν πιο αποτελεσματικά. Για τον σκοπό αυτό, τα τελευταία χρόνια, γίνεται όλο και πιο πολύ χρήση μεθόδων νανοτεχνολογίας, προσφέροντας λύσεις στα παραπάνω προβλήματα μέσω της ενθυλάκωσης των βιοδραστικών ουσιών η οποία προσφέρει ποικίλα πλεονεκτήματα, όπως αναλύεται παρακάτω. Η εξέλιξη των μεθόδων αυτών για την παρασκευή πιο αποτελεσματικών σκευασμάτων, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη νέων τεχνικών τεχνικών εκχύλισης και επεξεργασίας βιοδραστικών ενώσεων αναμένεται να προσφέρει σημαντικές προοπτικές για το μέλλον και να οδηγήσει σε δραματική ανάπτυξη του κλάδου των συμπληρωμάτων διατροφής τα οποία, όπως και τα λειτουργικά τρόφιμα, πιθανά να ανοίγουν το δρόμο για μία νέα στρατηγική πρόληψης αντί για θεραπεία.

## **2.1 Τα συμπληρώματα διατροφής ως απαραίτητο τμήμα της διατροφής**

Ως συμπληρώματα διατροφής, σύμφωνα με με την οδηγία Food Supplements Directive (FSD) 2002/46/EC, ορίζονται τα βρώσιμα προϊόντα που ως στόχο έχουν να ενισχύσουν την κανονική (καθημερινή) διατροφή και τα οποία αποτελούν συμπυκνωμένες πηγές θρεπτικών συστατικών ή άλλων ουσιών με θρεπτικό ή βιοδραστικό αποτέλεσμα (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex:32002L0046>). Στις μέρες μας, η χρήση τους, έχει αυξηθεί εκθετικά λόγω των έντονων ρυθμών ζωής και της μη ισορροπημένης διατροφής και θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά, έχοντας ως κύριο μέλημα την βελτίωση της υγείας και



τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών μέσω της πρόληψης (Shahidi, 2012).

Όπως έγινε φανερό με την πάροδο του χρόνου, η προσέγγιση που ακολούθησε η φαρμακευτική βιομηχανία κατά τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, που ως στόχο είχε την καταπολέμηση παθολογικών καταστάσεων με χρήση ενός μοναδικού θεραπευτικού μορίου αποδείχτηκε ανεπαρκής. Έτσι, άρχισε να γίνεται ολοένα και πιο εμφανής η ανάγκη μιας ολιστικής θεραπευτικής προσέγγισης η οποία δίνει βάση στο σύνολο των θρεπτικών συστατικών που προσλαμβάνονται από τον άνθρωπο για την διατήρηση και ενίσχυση της ορθής λειτουργίας του οργανισμού, λύση η οποία αναμένεται να δοθεί με την συνδιαστική χρήση συμπληρωμάτων διατροφής βασισμένων σε φυτικές και άλλες βιοδραστικές ουσίες και φαρμάκων όποτε κρίνεται απαραίτητο. Η συσχέτιση μεταξύ των φυτών και της διατήρησης/ βελτίωσης της υγείας, οδήγησε στην ανάπτυξη αυτής της νέας γενιάς μεθόδων πρόληψης και θεραπείας παθολογικών καταστάσεων, βασισμένων στις βιοδραστικές ουσίες των φυτών, οι οποίες συχνά χρησιμοποιούνται και σε συνδυασμό με άλλα συστατικά όπως βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία και οδηγούν στην παρασκευή νέων προϊόντων όπως τα συμπληρώματα διατροφής και τα λειτουργικά τρόφιμα. Τα προϊόντα αυτά, κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος, στο πλαίσιο της ολιστικής προσέγγισης που πλέον προτείνεται και σύντομα προβλέπεται να λαμβάνονται ως συμπληρωματικά των συμβατικών φαρμάκων αλλά και των θρεπτικών στοιχείων που λαμβάνονται από τη διατροφή, προκειμένου να ενισχυθεί η πρόληψη και η θεραπεία ασθενειών, προσδίδοντας παράλληλα μεγαλύτερη αξία στην γεωργία. Επιπλέον, η ανάγκη συμπληρωμάτων διατροφής κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική για την πρόσληψη βιοδραστικών ουσιών απαραίτητων για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού και την ενίσχυση φαρμακευτικών αγωγών, οι οποίες όμως είναι δύσκολο να προσληφούν αποκλειστικά από τη διατροφή. Για τους λόγους αυτούς, άρχισε η επαναφορά των φυτών στη βιομηχανία των φαρμάκων και η συνδιαστική χρήση τους με άλλα θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες, μέταλλα και αντιοξειδωτικά προκειμένου να ενισχυθεί η δράση και η αποτελεσματικότητά τους μέσω των συνεργιστικών δράσεων (Raskin et al., 2002). Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που οδήγησαν στην ολιστική θεραπεία είναι η ανθεκτικότητα που φάνηκε να προκαλεί η χορήγηση ενός μόνο φαρμάκου που περιέχει μία μοναδική βιοδραστική ουσία και η πολυπαραγοντική φύση πολλών πολύπλοκων ασθενειών όπως ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος κλπ, οι οποίες δεν μπορούν να αποδοθούν σε ένα μεμονωμένο γονίδιο ή περιβαλλοντικό παράγοντα καθώς οφείλονται σε συνδυασμό πολλαπλών συνθηκών (Kiberstis, Paula; Roberts, 2002) και κατ' επέκταση χρειάζονται συνδυασμένες θεραπευτικές μεθόδους.

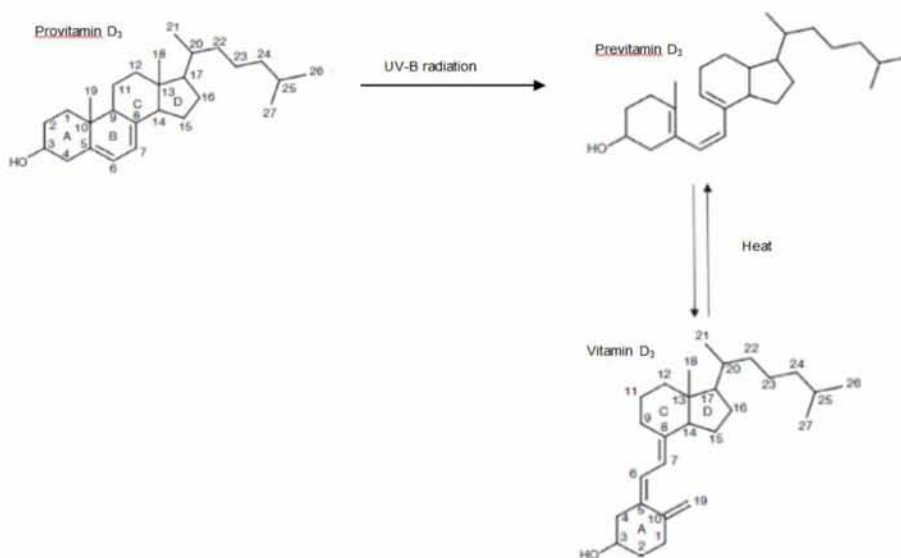


Έχοντας υπόψιν τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτή η ανάγκη πρόσληψης όλων των απαραίτητων συστατικών για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Έτσι, στα πλαίσια της ολιστικής προσέγγισης είναι έντονη η ανάγκη ύπαρξης κατάλληλων συμπληρωμάτων Βιταμίνης D, προκειμένου να αποφεύγεται η έλλειψή της, η οποία δημιουργεί πληθώρα σοβαρών προβλημάτων υγείας. Όπως έχει αποδειχτεί, η λήψη τους είναι συχνά απαραίτητη, προκειμένου να επιτευχθεί η αύξηση των επιπέδων Βιταμίνης D έστω στην ελάχιστη συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη. Υπολογίζεται μάλιστα, πως η χρήση τους, προλαμβάνει την ανεπάρκειά της σε ποσοστό έως 98% στον γενικό πληθυσμό (Michael F. Holick, 2006).

## 2.2 Ο ρόλος της Βιταμίνης D στον οργανισμό

Η Βιταμίνη D ( $D_2$ , εργοκαλσιφερόλη και  $D_3$ , χοληκαλσιφερόλη), είναι αλλιώς γνωστή και ως η βιταμίνη του ήλιου, καθώς η ακτινοβολία UVB που παράγεται από αυτόν, βοηθάει στην ενδογενή παραγωγή της, αποτελώντας την κύρια πηγή Βιταμίνης D για τον οργανισμό.

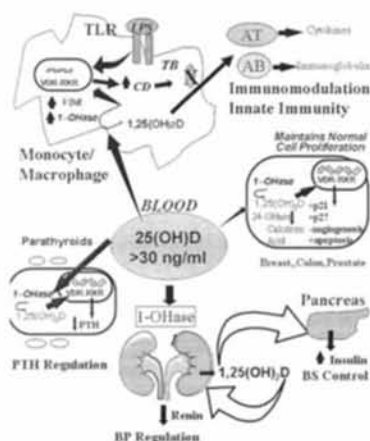
Η επαφή του δέρματος με ακτινοβολία UVB, επάγει την φωτόλυση της 7-δεϋδροχοληστερόλης προς την παραγωγή προβιταμίνης  $D_3$ , η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε βιταμίνη  $D_3$  με τη βοήθεια της θερμοκρασίας του δέρματος (**Εικόνα 1**) και ακολούθως υπόκειται σε 2 συνεχόμενες υδροξυλιώσεις.



**ΕΙΚΟΝΑ 1.** Φωτοχημική μετατροπή της προβιταμίνης  $D_3$  σε Βιταμίνη  $D_3$   
(Hewavitharana & Gomes, 2016)

Αρχικά μεταβολίζεται στο συκώτι σε  $25(OH)D$  και στη συνέχεια στα νεφρά

μετατρέπεται σε  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , την βιολογικά ενεργή μορφή της. Ύστερα, εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρεται στο έντερο και τα οστά, που αποτελούν τους κύριους στόχους της, όπου αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς της Βιταμίνης D (VDR), αυξάνοντας την απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο και ενεργοποιώντας την οστεοκλαστική δραστηριότητα. Ωστόσο, υπάρχουν κι άλλοι ιστοί οι οποίοι διαθέτουν τον ενζυματικό μηχανισμό της μετατροπής αυτής και η παραγωγή της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  σε αυτούς, είναι συνδεδεμένη με την λειτουργία γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, ενισχύοντας την συσχέτιση της ανεπάρκειας Βιταμίνης D με την εμφάνιση πολλών τύπου καρκίνου (Michael F Holick & Chen, 2008) (Michael F. Holick, 2006). Ο προσδέτης  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα βιταμίνης D (VDR) και επάγει την αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου και του φωσφόρου από το έντερο. Επιπλέον, εμπλέκεται στον σχηματισμό των οστών και στην διατήρηση της νευρομυϊκής λειτουργίας (Michael F Holick, 2004), (Michael F. Holick, 2002).



**EIKONA 2.** Μεταβολισμός της 25-υδροξυβιταμίνης  $D[25(\text{OH})\text{D}]$ , σε 1,25 διυδροξυβιταμίνη  $D[1,25(\text{OH})_2\text{D}]$  για τις μη σκελετικές λειτουργίες. (Holick & Chen, 2008)

Τα τελευταία χρόνια, έχει πραγματοποιηθεί σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη μελέτη της Βιταμίνης D, παρέχοντας πληροφορίες για τη σημασία της όχι μόνο στην υγεία των οστών αλλά και στα οφέλη που προσφέρει και σε άλλους ιστούς, προλαμβάνοντας μεγάλο εύρος ασθενειών. Η παρουσία των υποδοχέων VDR σε διάφορα όργανα και ιστούς, υποδηλώνει ότι ενδεχομένως η βιταμίνη D να εμπλέκεται και σε μη σκελετικές βιολογικές διαδικασίες. Επιπλέον, καθώς συμμετέχει σε ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια, έχει φανεί ότι η ανεπάρκειά της παίζει ρόλο στην αδυναμία του ανοσοποιητικού συστήματος και στην εμφάνιση ασθενειών όπως ο διαβήτης τύπου 1, ο υπερπαραθυρεοϊδισμός, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η σκλήρυνση κατά

πλάκας, η ασθένεια του Κρον, η υπέρταση αλλά και διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις (Michael F. Holick, 2006), (Micheal F Holick & Chen, 2008).

Γίνεται λοιπόν αντιληπτή η εξαιρετική σημασία που έχει η βιταμίνη αυτή για την διατήρηση της υγείας των οστών και όχι μόνο, αλλά και για την πρόληψη διάφορων σοβαρών παθήσεων με τις οποίες η έλλειψή της έχει συνδεθεί. Η ημερήσια συνιστώμενη δόση σε κάθε στάδιο της ζωής ενός ανθρώπου, για την διατήρηση ενός υγιούς σκελετού, παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1**. Συγκεκριμένα, το 2011 η αναφορά διατροφικής πρόσληψης Βιταμίνης D, προσδιορίζει τη συνιστώμενη δόση ως εξής: 400 IU/ημέρα για βρέφη, 600 IU/ημέρα για παιδιά και ενήλικες μέχρι την ηλικία των 70 ετών και 800 IU/ημέρα για ηλικίες 71 ετών και άνω. Τα δεδομένα αυτά προέκυψαν σύμφωνα με το Ινστιτούτο Ιατρικής (Institute of Medicine- IOM), μετά από ενδελεχή μελέτη (βλ. Ενότητα «Πίνακες»- Παράρτημα Ι) (Ross et al., 2011).

Δυστυχώς στις μέρες μας, η έλλειψη Βιταμίνης D, έχει πάρει διαστάσεις επιδημίας σε πολλούς πληθυσμούς παγκοσμίως, ανεξάρτητα την ηλικία ή την κατάσταση υγείας και έχει ποικίλες σκελετικές ή μη επιπτώσεις (Michael F. Holick, 2006). Αυτό συμβάνει γιατί η κύρια πηγή της είναι η ηλιακή ακτινοβολία η οποία δεν μπορεί να δράσει όταν το δέρμα είναι καλλυμένο με ρούχα ή αντηλιακό. Επιπλέον, πολύ λίγα τρόφιμα περιέχουν φυσικά βιταμίνη D, όπως τα λιπαρά ψάρια (σολομός, σαρδέλες κ.α.), μερικά έλαια ψαριών (μουρουνέλαιο), οι κρόκοι των αυγών και τα μανιτάρια. Ακόμα και τα τρόφιμα που είναι ενισχυμένα με βιταμίνη D είναι συχνά ανεπαρκή για να ικανοποιήσουν τις διατροφικές απαιτήσεις είτε των παιδιών είτε των ενηλίκων, καθώς η Βιταμίνη D υπόκειται εύκολα σε υποβάθμιση κατά την παρασκευή ή φύλαξη των προϊόντων, λόγω της ευαισθησίας της (Micheal F Holick & Chen, 2008).

### **2.3 Η αγορά των συμπληρωμάτων διατροφής**

Τα συμπληρώματα διατροφής, προσελκύουν εδώ και πολλές δεκαετίες την προσοχή της φαρμακευτικής βιομηχανίας αλλά και των καταναλωτών, λόγω της πληθώρας των πλεονεκτημάτων που προσφέρουν. Είναι πιο απλή και εύκολη η διαδικασία που απαιτείται για να βγουν στην αγορά και παρασκευάζονται με μικρότερο κόστος από τα συνθετικά σκευάσματα. Επιπλέον, όταν αυτά περιέχουν

φυτικά συστατικά, εκμεταλλεύονται την ικανότητα των φυτών να συνθέτουν μίγματα δομικά διαφορετικών βιοενεργών ενώσεων τα οποία παρέχουν πολλαπλά θεραπευτικά αποτελέσματα στο πλαίσιο της ολιστικής προσέγγισης πρόληψης και θεραπείας, σε αντίθεση με τα φάρμακα που περιέχουν μία μόνο βιοδραστική ουσία. Τέλος είναι ευρέως αποδεκτά από το καταναλωτικό κοινό λόγω της αντίληψης που υπάρχει πως οτιδήποτε φυσικό είναι και ασφαλές, αλλά και επειδή δεν χρειάζεται συνταγογράφηση για την λήψη τους.

Η ζήτηση που υπάρχει όσον αφορά τα συμπληρώματα διατροφής, εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων όπως, το ποσοστό του πληθυσμού ηλικιωμένων, την αυξανόμενη τάση για αυτό-θεραπεία, την δυσπιστία έναντι των συμβατικών θεραπευτικών μεθόδων, αλλά και την πεποίθηση πως ό,τι είναι φυσικό είναι και υγιεινό και πως τα φυτικά προϊόντα είναι ασφαλή. Αυτές οι τάσεις υποδηλώνουν την διαρκώς αυξανόμενη ζήτηση για συμπληρώματα διατροφής.

Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες δείχνουν ότι η χρήση φυτικών συμπληρωμάτων διατροφής είναι ευρέως διαδεδομένη, με τρεις στους δέκα Αμερικάνους να λαμβάνει τέτοιου τύπου σκευάσματα. Τα πιο κοινά συμπληρώματα διατροφής που λαμβάνονται, σύμφωνα με σχετικές μελέτες, είναι αυτά που περιέχουν βιταμίνες, είτε σε συνδυασμό με ιχνοστοιχεία, είτε όχι (Rock, 2007). Όσον αφορά την παγκόσμια αγορά, το 1999 ξεπέρασε τα 15 δισεκατομμύρια \$, με αγορά 7 δισεκατομμυρίων \$ στην Ευρώπη, 2,4 δισεκατομμύρια \$ στην Ιαπωνία, 2,7 δισεκατομμύρια \$ στα υπόλοιπα της Ασίας και 3 δισεκατομμύρια \$ στη Βόρεια Αμερική (Sotelo, Sousa, & Sanchez, 1995). Συγκεκριμένα, στην έρευνα National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) που διεξήχθη την περίοδο 1999–2000, αναφέρθηκε ποσοστό 52% των ενηλίκων να λαμβάνουν συμπληρώματα διατροφής μέσα στον προηγούμενο μήνα, με το 35% να κάνει συχνή χρήση πολυβιταμινούχων σκευασμάτων, ενώ τα ποσοστά αυτά αυξήθηκαν στις ακόλουθες έρευνες NHANES II και III (Rock, 2007). Το 2009 η παγκόσμια αγορά των συμπληρωμάτων διατροφής είχε εκτιμηθεί αξίας € 45 - € 50 δις. Παρόλο που στις ΗΠΑ είναι μεγαλύτερη η παράδοση χρήσης συμπληρωμάτων διατροφής, την ίδια χρονιά η εκτίμηση της αξίας της αγοράς της ΕΕ ήταν μεταξύ € 8,2- € 8,6 δις που μεταφράζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 25% της παγκόσμιας αγοράς, με την Ιταλία, την Γερμανία, την Γαλλία και το Ηνωμένο Βασίλειο να αντιπροσωπεύουν περίπου τα τρία τέταρτα της συνολικής αγοράς της ΕΕ. Στην ΕΕ, το μεγαλύτερο μερίδιο της αγοράς (50-55%: € 4,1- € 4,73 δις) κατέχουν οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία (Nicoletti, 2012). Στις μέρες μας, ο κλάδος αποδίδει αποδίδει 50

δισεκατομμύρια δολάρια παγκοσμίως και ενδέχεται να σημειωθεί αύξηση της τάξης του 4% ετησίως μέσα στο 2018.

### **2.3.1 Συμπληρώματα Βιταμίνης D στην Ελλάδα**

Όπως διαπιστώθηκε παραπάνω, η βιταμίνη D και το ασβέστιο, έχουν καθοριστικό ρόλο για τη λειτουργία του οργανισμού και την διατήρηση ενός υγιούς σκελετού. Ωστόσο, στην εποχή μας, είναι συχνά απαραίτητη η λήψη συμπληρωμάτων διατροφής προκειμένου να επιτυχθεί η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη. Στην ελληνική αγορά, κυκλοφορεί πληθώρα σκευασμάτων με στόχο την ενίσχυση της επάρκειας της Βιταμίνης D στον οργανισμό, σε διάφορες μορφές όπως ταμπλέτες, κάψουλες, σταγόνες και σπρέι. Παρόλα αυτά, τα υπάρχοντα συμπληρώματα διατροφής παρουσιάζουν μειονεκτήματα και κατά συνέπεια δεν παρέχουν στον οργανισμό την επαρκή συνιστώμενη δόση.

Ένα από τα βασικότερα προβλήματα που υπάρχουν, είναι η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση λόγω του ότι η Βιταμίνη D είναι λιποδιαλυτή. Επιπλέον, οι δοσολογίες είναι πολύ μικρές και στις περισσότερες περιπτώσεις τα σκευάσματα περιέχουν μόνο Βιταμίνη D με αποτέλεσμα να μην παρέχονται στον οργανισμό όλες οι πιθανές δραστηριότητές της, καθώς η Βιταμίνη D δρα συνδυαστικά με το Ασβέστιο, ενισχύοντας τις δράσεις του και προσφέροντας έτσι ποικίλα οφέλη για την υγεία. Έτσι, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, οι καταναλωτές που επιθυμούν να ακολουθήσουν μία ολοκληρωμένη αγωγή, αναγκάζονται να λαμβάνουν δύο ξεχωριστά σκευάσματα. Τέλος, αυτά που παρέχουν τον συνδυασμό των δύο βιοδραστικών ουσιών, δεν καλύπτουν την ημερήσια συνιστώμενη δόση για καμία από τις δύο ουσίες.

Έγινε λοιπόν φανερό η έλλειψη ενός σκευάσματος που θα προσφέρει συνδυασμό των δύο ουσιών και το οποίο θα διαθέτει αυξημένη αποτελεσματικότητα, παρέχοντας όλα τα πιθανά οφέλη για τον οργανισμό. Για το σκοπό αυτό, ξεκίνησε η ανάπτυξη νανογαλακτώματος, το οποίο θα περιείχε τις απαραίτητες δοσολογίες και για τα δύο συστατικά. Επιπλέον, η ύπαρξη ελαιολάδου υψηλής συγκέντρωσης πολυφαινόλων, επιλέχθηκε προκειμένου να ενισχυθούν δράσεις της Βιταμίνης D όπως, η καρδιαγγειακή προστασία, η μείωση της πιθανότητας εμφάνισης διάφορων τύπου καρκίνων και επίσης να βοηθήσει στη μείωση των τριγλυκεριδίων. Στόχος

ήταν, η παρασκευή ενός ολοκληρωμένου προϊόντος, βασισμένου σε φυσικά συστατικά, που θα προσφέρει όλα τα οφέλη των περιεχόμενων συστατικών στον οργανισμό όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

### **3. ΝΑΝΟΔΙΑΣΠΟΡΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

Στις μέρες μας, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής, με αποτέλεσμα το καταναλωτικό κοινό να στρέφεται προς τα φυσικά προϊόντα και τα συμπληρώματα διατροφής, προκειμένου να γίνεται εφικτή η επαρκής πρόσληψη όλων των απαραίτητων συστατικών για τον οργανισμό. Ωστόσο, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω στο Κεφάλαιο 2.2, ένα σημαντικό πρόβλημα του πληθυσμού αποτελεί η ανεπάρκεια Βιταμίνης D. Για την αντιμετώπισή της γίνεται απαραίτητη η λήψη συμπληρωμάτων διατροφής, η χρήση των οποίων παρουσιάζει εκθετική αύξηση, ανεξάρτητα με την ηλικία ή την κατάσταση υγείας του ατόμου. Παρά το γεγονός ότι σήμερα στην αγορά υπάρχει πληθώρα προϊόντων για το σκοπό αυτό, φαίνεται καθένα να παρουσιάζει διαφορετικό μειονέκτημα όσον αφορά την απορρόφηση, την αποτελεσματικότητα ή και τις πιθανές παρενέργειες που μπορεί να προκαλεί.

Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια της ολιστικής προσέγγισης πρόληψης και θεραπείας που πλέον εφαρμόζεται, στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε ένα βιοσυμβατό, μη-τοξικό και ασφαλές νανογαλάκτωμα, βασισμένο στο ελαιόλαδο, με σκοπό να αποτελέσει κατάλληλο φορέα για την ενθυλάκωση της Βιταμίνης D, προκειμένου να αυξηθεί η προστασία από την υποβάθμιση και η απορρόφησή της από τον οργανισμό. Στόχος είναι το προτεινόμενο σύστημα να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής Βιταμίνης D και Ασβεστίου ως μέρος των προϊόντων εταιριών αυτού του κλάδου.

Η χρήση ουσιών που παρουσιάζουν βιολογική δράση, όπως οι βιταμίνες, τα ιχνοστοιχεία, τα αντιοξειδωτικά, τα προβιοτικά κ.λπ. είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην βιομηχανία των φαρμάκων αλλά και των τροφίμων. Η απευθείας ενσωμάτωσή τους στα σκευάσματα παρουσιάζει πολλές προκλήσεις για την επιστήμη καθώς οι περισσότερες είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και προκειμένου να παραμείνουν λειτουργικές και αποτελεσματικές για τον οργανισμό είναι απαραίτητη η προστασία τους από εξωγενείς παράγοντες κατά την επεξεργασία και αποθήκευση. Επίσης,

είναι σημαντικό να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα συστατικά του σκευάσματος ή της συσκευασίας που το περικλείει. Τέλος, υπάρχουν δυσκολίες όσον αφορά την ενσωμάτωση λιπόφιλων ουσιών σε υδατικό περιβάλλον και το αντίθετο.

Την λύση στα παραπάνω προβλήματα καλείται να προσφέρει η νανοτεχνολογία μέσω της ενθυλάκωσης των βιοδραστικών συστατικών σε συστήματα στη νανοκλίμακα (νανοενθυλάκωση). Παρόλο που ο κλάδος των συμπληρωμάτων διατροφής δεν απαιτεί τις κλινικές μελέτες και τις δυσκολίες που απαιτούνται προκειμένου ένα φάρμακο να βγει στην αγορά, ωστόσο υπάρχουν ορισμένοι, νομοθετικοί κυρίως, περιορισμοί όσον αφορά τα συστατικά και τις μεθοδολογίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε σχέση με άλλους τομείς βιομηχανικής παραγωγής (Narang, Delmarre, & Gao, 2007). Επομένως, η νανοενθυλάκωση στον τομέα εδωδιμων προϊόντων, αφορά κυρίως υγρές νανοδιασπορές τύπου μικρογαλακτώματος, νανογαλακτώματος όπως επίσης και νανολιποσώματα.

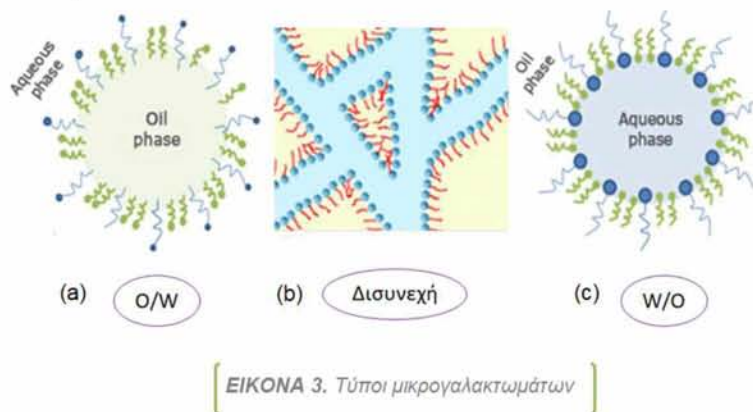
### **3.1 Συστήματα ενθυλάκωσης (μικρο-/νανο-γαλακτώματα) και χαρακτηριστικά**

Ως κολλοειδείς διασπορές γενικά, χαρακτηρίζονται τα ετερογενή συστήματα που αποτελούνται από ένα εναιώρημα μικρών σωματιδίων κατανεμημένων εντός μιας συνεχούς φάσης. Μια κατηγορία κολλοειδών διασπορών υγρού σε υγρό είναι τα γαλακτώματα τα οποία μπορούν να παρασκευαστούν με τον συνδιασμό ελαίου, νερού και επιφανειοενεργών. Ο συνδιασμός αυτών των τριών συστατικών, μπορεί να σχηματίσει διάφορα είδη συστημάτων, κάτι που εξαρτάται από την αναλογία τους και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (κυρίως θερμοκρασία). Καθώς οι κολλοειδείς διασπορές με πολύ μικρό μέγεθος σωματιδίων παρέχουν πληθώρα πλεονεκτημάτων, έναντι των συμβατικών, είναι συχνά επιθυμητή η χρήση τους για κάποιες εφαρμογές στις οποίες μπορεί να χρειάζεται βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών ή της σταθερότητας του τελικού προϊόντος. Οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες κολλοειδείς διασπορές ως συστήματα παράδοσης (delivery systems) σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους, είναι τα μικρογαλακτώματα και τα νανογαλακτώματα.

Τα μικρογαλακτώματα ορίζονται ως θερμοδυναμικά σταθερά, οπτικά ισότροπα υγρά που σχηματίζονται με ανάμιξη ελαίου, νερού και επιφανειοενεργών ουσιών. Ο



όρος «έλαιο», αναφέρεται σε κάθε υγρό αδιάλυτο στο νερό. Προκειμένου να επιτευχθεί η αμοιβαία διαλυτότητα ελαίου/νερού, είναι απαραίτητη η ύπαρξη των επιφανειοενεργών για τη μείωση της μεσεπιφανειακής τάσης μεταξύ τους. Τα επιφανειοενεργά είναι αμφίφιλα μόρια τα οποία διαθέτουν μία μη πολική υδρόφοβη ουρά, που προσανατολίζεται στην περιοχή του ελαίου και μία υδρόφιλη κεφαλή, η οποία στρέφεται προς την υδατική φάση. Τα μικρογαλακτώματα μπορούν να διακριθούν σε τρεις τύπους που εξαρτώνται από την αναλογία των συστατικών και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3**. Υπάρχουν τα μικρογαλακτώματα (a) ελαίου-σε-νερό (o/w), όπου η ελαιώδης φάση διασπείρεται στην υδατική, τα (c) νερού-σε-έλαιο (w/o) στα οποία η διεσπαρμένη φάση είναι η υδατική και η συνεχής είναι η ελαιώδης και τέλος, (b) οι δισυνεχείς διασπορές (Qian & McClements, 2011).

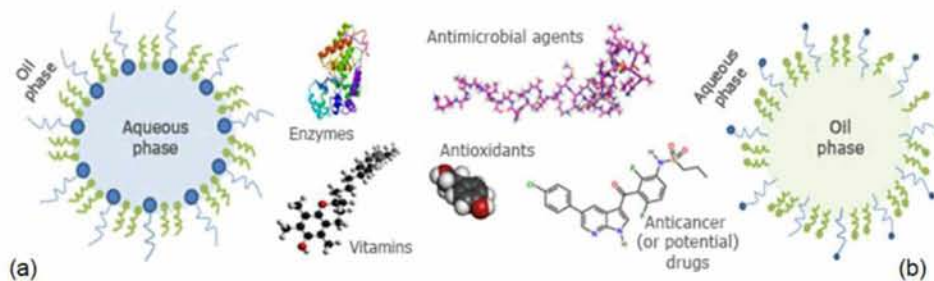


Ο σχηματισμός των μικρογαλακτωμάτων πραγματοποιείται αυθόρμητα, με απλή ανάμιξη των συστατικών, χωρίς να απαιτείται εφαρμογή μεθόδων υψηλής ενέργειας γαλακτωματοποίησης και το συνήθες μέγεθος των διεσπαρμένων σταγονιδίων κυμαίνεται μεταξύ 5-50 nm. Είναι συστήματα χαμηλού ιξώδους και έχουν μεγάλη ικανότητα διαλυτοποίησης ενώσεων διαφορετικής πολικότητας, για αυτό βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους κλάδους όπως των τροφίμων, τον φαρμακευτικό, των καλλυντικών, τον αγροχημικό κ.α.

Ο όρος νανογαλακτώμα αναφέρεται σε κινητικά σταθερές κολλοειδείς διασπορές μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών εκ των οποίων το ένα βρίσκεται διεσπαρμένο σε μορφή σταγονιδίων, αποτελώντας την ασυνεχή φάση, στη μάζα του άλλου (συνεχής φάση). Αποτελούνται από έλαιο, νερό και επιφανειοενεργές ουσίες και σχηματίζονται από τη διάσπαση μεγαλύτερων σταγονιδίων, ήδη σχηματισμένων προγαλακτωμάτων συνήθως με χρήση μεθόδων ομογενοποίησης υψηλής ενέργειας, δίνοντας ως αποτέλεσμα διεσπαρμένα σφαιρικά σταγονίδια διαμέτρου 50-500 nm, ανάλογα τη βιβλιογραφία. Τα νανογαλακτώματα μπορούν, όπως και τα



μικρογαλακτώματα, να χαρακτηριστούν ως (α) νερού-σε-έλαιο (w/o) και (β) ελαίου-σε-νερό (o/w) και χρησιμεύουν ως συστήματα εγκλωβισμού και προστασίας τόσο υδρόφιλων, όσο και λιπόφιλων συστατικών σε μορφή που μπορεί να διασκορπιστεί καταλλήλως σε υδατικά μέσα ή το αντίστροφο, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4**.



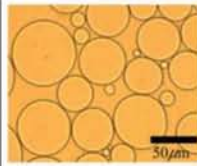
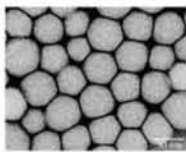
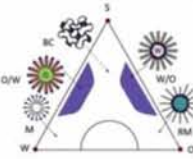
**ΕΙΚΟΝΑ 4.** Τύποι νανογαλακτωμάτων (α) νερό-σε-έλαιο (w/o), (β) έλαιο-σε-νερό (o/w) και πιθανές ουσίες προς ενθυλάκωση

Τα νανογαλακτώματα μπορούν να είναι διαυγή, θολερά ή γαλακτερά, ανάλογα με η διάμετρο των διεσπαρμένων σωματιδίων και βρίσκουν αντίστοιχες εφαρμογές με τα μικρογαλακτώματα σε βιομηχανικούς τομείς όπως των τροφίμων, των φαρμάκων, των καλλυντικών κ.α.

Τα μικρογαλακτώματα και τα νανογαλακτώματα εμφανίζουν πολλές ομοιότητες και για το λόγο αυτό, συχνά δημιουργείται σύγχυση ως προς τον ορισμό των συστημάτων. Ωστόσο, είναι σημαντικό οι δύο αυτοί τύποι να αναγνωρίζονται σωστά, καθώς οι διακριτές διαφορές τους επηρεάζουν τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τους, τις στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίησή τους και τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό των λειτουργικών χαρακτηριστικών τους.

Αρχικά, παρόλο που και τα δύο συστήματα μπορούν να παρασκευαστούν με χρήση των ίδων συστατικών (έλαιο, νερό και επιφανειοενεργό), οι απαιτούμενες αναλογίες και συνθήκες διαφέρουν. Τα νανογαλακτώματα συνήθως απαιτούν μικρότερη περιεκτικότητα επιφανειοενεργού για να σχηματιστούν, σε σχέση με τα μικρογαλακτώματα και επομένως εμφανίζουν πλεονεκτήματα στη χρήση, ιδίως όταν οι επιφανειοενεργές ουσίες υπόκεινται σε νομοθετικό περιορισμό. Επιπλέον τα μικρογαλακτώματα σχηματίζονται αυθόρμητα, με απλή ανάμιξη των συστατικών τους και είναι θερμοδυναμικά σταθερά, ενώ τα νανογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή αλλά κινητικά σταθερά και απαιτείται συνήθως παροχή ενέργειας προκειμένου να επιτευχθεί η παρασκευή τους. Ενώ και τα δύο αυτά συστήματα έχουν καλύτερη σταθερότητα στη συσσώρευση σωματιδίων και στον βαρυτικό διαχωρισμό

σε σχέση με τα συμβατικά γαλακτώματα (Tadros, Izquierdo, Esquena, & Solans, 2004), ωστόσο διαφέρουν ως προς τη διάμετρο των σχηματιζόμενων σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5**, που συνοψίζει τα βασικά χαρακτηριστικά των τριών τύπων διασποράς. Τέλος, τα νανογαλακτώματα είναι λιγότερο ευαίσθητα απέναντι την αραίωση, τη θερμοκρασία και τις μεταβολές του pH σε σύγκριση με τα μικρογαλακτώματα.

	macroemulsions	nanoemulsions	microemulsions
			
size	1-100 μm	20-500 nm	10-100 nm
shape	spherical	spherical	spherical, lamellar
stability	thermodynamically unstable, weakly kinetically stable	thermodynamically unstable, kinetically stable	thermodynamically stable
method of preparation	high & low energy methods	high & low energy methods	low energy method
polydispersity	often high (>40%)	typically low (<10-20%)	typically low (<10%)

**ΕΙΚΟΝΑ 5.** Σύγκριση γαλακτωμάτων, νανογαλακτωμάτων και μικρογαλακτωμάτων (Gupta, Eral, Hatton, & Doyle, 2016)

### 3.2 Χρησιμότητα ενθυλάκωσης και ενθυλάκωση θρεπτικών συστατικών σε νανοσυστήματα

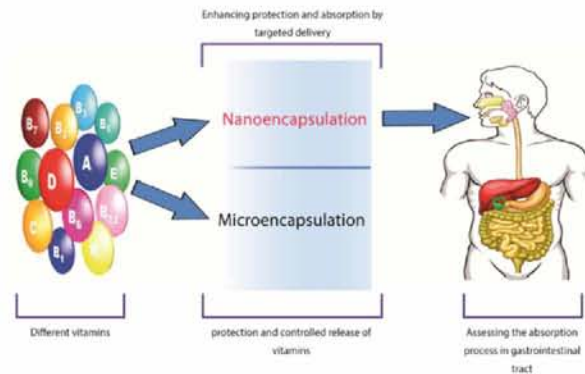
Το ενδιαφέρον αρκετών βιομηχανιών, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων, των φαρμάκων και των διατροφικών συμπληρωμάτων, για παραγωγή βρώσιμων συστημάτων εγκλωβισμού και μεταφοράς κατάλληλων για λιπόφιλες βιοδραστικές ενώσεις είναι έντονο. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αυτούσια ενσωμάτωση των βιοδραστικών στα σκευάσματα ενέχει κάποια προβλήματα και παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα. Βασικό εμπόδιο αποτελεί η ευαισθησία των περισσότερων βιοδραστικών ουσιών στη θερμοκρασία, την επεξεργασία, την οξείδωση κλπ (Katouzian & Jafari, 2016) λόγω της οποίας μειώνεται η λειτουργικότητα και η απορρόφησή τους από τον οργανισμό. Επιπλέον, με την απευθείας ενσωμάτωσή τους, δε μπορούν να διατηρήσουν τις ιδιότητές τους καθώς υπάρχει ο κίνδυνος να αλληλεπιδράσουν με τα υπόλοιπα συστατικά του σκευάσματος ή με την συσκευασία που το περιέχει. Τέλος, λόγω της φυσικής

κατάστασης ορισμένων ουσιών, παρουσιάζεται δυσκολία στην ενσωμάτωσή τους, η οποία μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Τέλος, οι λιποδιαλυτές κυρίως ουσίες παρουσιάζουν συχνά χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα στον οργανισμό λόγω χαμηλής διαλυτότητας στο υδατικό περιβάλλον του εντέρου, χαμηλής διαπερατότητας διαμέσω των ιστών, μικρού χρόνου ημιζωής και ανεπαρκούς κατανομής στους ιστούς.

Προκειμένου να υπερνικηθούν τα παραπάνω προβλήματα, κρίνεται αναγκαία η ενθυλάκωση των βιοδραστικών ουσιών σε κατάλληλους φορείς όπως στερεά σωματίδια, λιποσώματα, πολυμερή, δένδριμερή, γαλακτώματα κ.α. Η ενθυλάκωση ορίζεται ως η δημιουργία φραγμού για την παρεμπόδιση των δυσμενών χημικών αλληλεπιδράσεων και για την ελεγχόμενη απελευθέρωση βιοδραστικών συστατικών και είναι εξαιρετικά σημαντική ιδίως για τις λιποδιαλυτές βιταμίνες καθώς παρέχει προστασία από το εξωτερικό περιβάλλον και δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης. Επιπλέον, αποτελεί έναν οικονομικά αποδοτικό τρόπο βελτίωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος προσφέροντας τη δυνατότητα μεταβολής της ρευστότητας και της διαύγειας, όπως επίσης και της κάλυψης πιθανά ανεπιθύμητης γεύσης ή οσμής της βιταμίνης. Τέλος, με την μεθοδολογία αυτή, γίνεται εφικτή η παρασκευή πιο ολοκληρωμένων προϊόντων καθιστώντας εφικτό τον εμπλουτισμό των σκευασμάτων με ένα σύμπλεγμα βιταμινών το οποίο εκμεταλλεύεται τη συνεργιστική δράση μεταξύ τους καθώς καθιστά εφικτή την ταυτόχρονη παρουσία βιοδραστικών ουσιών διαφορετικής διαλυτότητας (υδρόφιλων, λιπόφιλων) (Katouzian & Jafari, 2016).

Όταν ο θύλακας του εγκλωβισμού των βιοδραστικών ουσιών είναι στην νανοκλίμακα τότε αναφερόμαστε στην τεχνική της νανοενθυλάκωσης. Συγκεκριμένα, η νανοενθυλάκωση μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα ενός σκευάσματος προστατεύοντας τα ενθυλακωμένα βιοδραστικά συστατικά από χημική, φυσική και βιολογική υποβάθμιση που μπορούν να υποστούν κατά την επεξεργασία, την αλληλεπίδραση με τα άλλα συστατικά ή κατά την αποθήκευση. Επίσης, καθώς το σύστημα αποτελείται από δύο φάσεις διαφορετικής διαλυτότητας που συνενώνονται εγκλωβίζοντας την βιοδραστική ουσία, δίνεται η δυνατότητα στις λιποδιαλυτές ουσίες να ενσωματωθούν σε υδατικό μέσο και το αντίστροφο, αυξάνοντας την βιοδιαθεσιμότητα και την δραστηριότητά τους στον οργανισμό.





**ΕΙΚΟΝΑ 6.** Πλεονεκτήματα νανοενθυλάκωσης βιταμινών  
(Katouzian & Jafari, 2016)

Καθώς οι βιταμίνες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα μόρια, είναι απαραίτητη η προστασία τους από επιβλαβείς παράγοντες όπως η θέρμανση και η οξείδωση, προκειμένου να διατηρηθούν ανέπαφες οι ιδιότητες τους και να παραμείνουν λειτουργικές. Η νανοενθυλάκωση αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο για το σκοπό αυτό προσφέροντας πλεονεκτήματα όπως ταχύτερη απελευθέρωση και αυξημένη ενδοκυτταρική κυκλοφορία των βιταμινών, διείσδυση ακόμα και στις πιο μικρές «διόδους» του οργανισμού, δυνατότητα διοχέτευσης της βιταμίνης απευθείας στο κύτταρο-στόχο, ελαχιστοποίηση των επιδράσεων των περιβαλλοντικών συνθηκών στις βιταμίνες και κατ' επέκταση αύξηση της διάρκειας ζωής τους μέσα στο σκεύασμα.

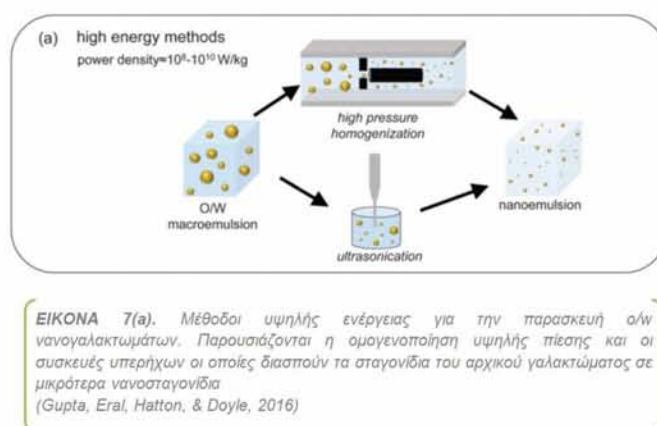
Όταν οι επιθυμητές βιοδραστικές ουσίες είναι λιποδιαλυτές βιταμίνες, τα καταλληλότερα μέσα ενθυλάκωσης αποτελούν τα νανογαλακτώματα ελαίου-σε-νερό. Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά τη διάλυση της βιταμίνης σε μία υγρή λιπαρή φάση, και έπειτα, την διασπορά της φάσης αυτής σε μία υδατική, με την χρήση επιφανειοενεργών ουσιών όπως θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω.

### 3.3 Νανογαλακτώματα: παρασκευή και ιδιότητες

Τα νανογαλακτώματα τυπικά σχηματίζονται μέσω μίας διαδικασίας δύο σταδίων όπου αρχικά παρασκευάζεται ένα μακρογαλάκτωμα (προγαλάκτωμα) και στη συνέχεια μετατρέπεται σε νανογαλάκτωμα σε ένα δεύτερο βήμα (Gupta, Eral, Hatton, & Doyle, 2016). Οι λιπόφιλες ενώσεις πρώτα διαλύονται στην ελαιώδη φάση και στη συνέχεια ομογενοποιούνται με την υδατική φάση, στην οποία διαλύεται το υδρόφιλο επιφανειοενεργό (Dima, Dima, & Iordăchescu, 2015) συνήθως μέσω μηχανικής ανάδευσης, σχηματίζοντας το αρχικό προγαλάκτωμα το οποίο στη

συνέχεια υπόκειται επιπλέον κατεργασία μέσω μεθόδων είτε (a) υψηλής, είτε (b) χαμηλής ενέργειας προκειμένου να παρασκευαστεί το τελικό νανογαλάκτωμα.

Οι προσεγγίσεις υψηλής ενέργειας χρησιμοποιούν συσκευές ικανές να παράγουν μηχανική ενέργεια ώστε να ασκηθούν «δυνάμεις διάσπασης» στα σταγονίδια μεγαλύτερου μεγέθους του αρχικού προγαλακτώματος με αποτέλεσμα την παραγωγή σταγονιδίων με διάμετρο στη νανοκλίμακα (50-500 nm). Το μέγεθος σταγονιδίων εξαρτάται από τον τύπο της συσκευής που θα χρησιμοποιηθεί και τις συνθήκες που εφαρμόζονται (θερμοκρασία, πίεση, χρόνος, σύσταση του νανογαλακτώματος, χαρακτηριστικά της κάθε φάσης π.χ. ιξώδες, επιφανειακή τάση). Οι πιο κοινές συσκευές που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μέθοδο είναι οι ομογενοποιητές υψηλής πίεσης (high pressure homogenizers, HPH), οι μικρορευστοποιητές (microfluidizers) και οι συσκευές υπερήχων (ultrasonication) και είναι βασικό, η πίεση που ασκούν στο προγαλάκτωμα να είναι ικανή να υπερνικήσει τις δυνάμεις που συγκρατούν τα σταγονίδια μεταξύ τους.

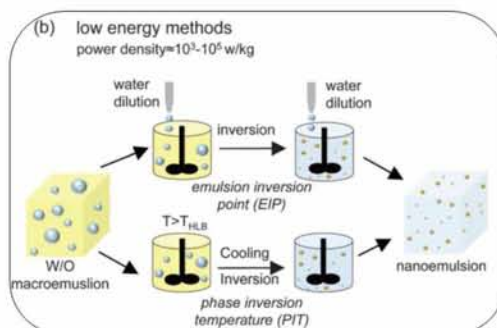


Αντίθετα, οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας βασίζονται στον αυθόρμητο σχηματισμό νανοσταγονιδίων, από μία λιπαρή, μία υδατική φάση και μια επιφανειοενεργή ουσία, ο οποίος λαμβάνει χώρα είτε με την αλλαγή της σύστασης του διαλύματος και των περιβαλλοντικών συνθηκών, είτε με αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση (spontaneous emulsification method). Η πρώτη μέθοδος της αλλαγή συνθηκών, περιλαμβάνει τεχνικές όπως το σημείο αναστροφής γαλακτώματος (emulsion inversion point, EIP), η οποία προκαλεί αναστροφή φάσης μέσω αραίωσης με νερό, η αναστροφή φάσης με μεταβολή της θερμοκρασίας (phase inversion temperature, PIT) και η αναστροφή φάσης με μεταβολή της σύστασης (phase inversion composition, PIC). Κατά την αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση, μία οπτικά διαυγής κολλοειδής διασπορά σχηματίζεται όταν μίγμα επιφανειοδραστικής ουσίας και λιπαρής φάσης προστίθεται στην υδατική φάση με ήπια ανάδευση. Οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας εκμεταλλεύονται συγκεκριμένες ιδιότητες του συστήματος



για τη δημιουργία μικρών σταγονιδίων χωρίς να καταναλώνουν σημαντική ενέργεια ωστόσο, απαιτούν μεγάλες ποσότητες συνθετικών επιφανειοενεργών ουσιών και η θερμοκρασία αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εφαρμογή τους.

(Gupta et al., 2016), (David Julian McClements, 2012)



**ΕΙΚΟΝΑ 7(b).** Μέθοδοι χαμηλής ενέργειας για την παρασκευή ο/ν νανογαλακτωμάτων. Οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας ξεκινούν με γαλακτώματα w/o και διασπούν τα μεγάλα σταγονίδια σε μικρότερα καθώς περνούν από μία κατάσταση χαμηλής διεπιφανειακής τάσης κατά τη διάρκεια της αντιστροφής φάσης. (Gupta, Eral, Hatton, & Doyle, 2016)

Ένα βρώσιμο σύστημα παράδοσης για λιπόφιλες βιοδραστικές ουσίες πρέπει να παρασκευάζεται έτσι ώστε να εκτελεί έναν αριθμό διαφορετικών ρόλων. Αρχικά, θα πρέπει να χρησιμεύσει ως μέσο ενθυλάκωσης του βιοδραστικού σε μια φυσική μορφή που να μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί στα σκευάσματα χωρίς να μεταβάλει τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες δηλαδή, δεν πρέπει να επηρεάζει δυσμενώς την εμφάνιση, τη γεύση, την υφή ή τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Επιπλέον, είναι απαραίτητο το σύστημα να παρέχει προστασία στην λιπόφιλη βιοδραστική ουσία από την χημική αποικοδόμηση κατά τη διάρκεια της παρασκευής, της αποθήκευσης, της μεταφοράς και της χρήσης έτσι ώστε να παραμένει λειτουργική, αλλά επίσης να είναι σε θέση να ελέγχει την απελευθέρωσή της σε ένα ορισμένο ρυθμό, σε μια συγκεκριμένη θέση και/ή σε απόκριση σε ένα συγκεκριμένο περιβαλλοντικό ερέθισμα (για παράδειγμα, pH, ιοντική ισχύ ή θερμοκρασία). Τέλος, το χρησιμοποιούμενο σύστημα θα πρέπει να παρασκευάζεται από συστατικά ασφαλή (GRAS) χρησιμοποιώντας απλές και αποδοτικές διαδικασίες επεξεργασίας, εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί με σκοπό την βρώση (D. J. McClements, Decker, & Weiss, 2007).

### 3.4 Επιλογή συστατικών νανογαλακτωμάτων

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επιλογή των κατάλληλων συστατικών των συστημάτων διασποράς που επιθυμούμε να παρασκευάσουμε καθώς έχουν αντίκτυπο τόσο στον τύπο τους (έλαιο-σε-νερό/νερό-σε-έλαιο ή μικρο-/νανο-

γαλάκτωμα), όσο και στα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητές τους. Είναι απαραίτητο να επιλέγονται με προσοχή, προκειμένου να έχουμε συστήματα αποτελεσματικά, που να βελτιώνουν τις ιδιότητες των βιοδραστικών ουσιών και να είναι κατάλληλα για την χρήση για την οποία προορίζονται (λήψη από του στόματος, διαδερμική, με ένεση κλπ). Στην προκειμένη περίπτωση, που στόχος μας είναι η παρασκευή νανογαλακτωμάτων για λήψη από του στόματος, ήταν βασικής σημασίας τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να είναι βιοσυμβατά, μη τοξικά και GRAS (Generally Recognized As Safe) (Gonnet, Lethuaut, & Boury, 2010). Το κάθε συστατικό επιλέχθηκε λόγω συγκεκριμένων ιδιοτήτων που διαθέτει, όπως θα αναλυθεί παρακάτω και όλα είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στην βιομηχανία τροφίμων.

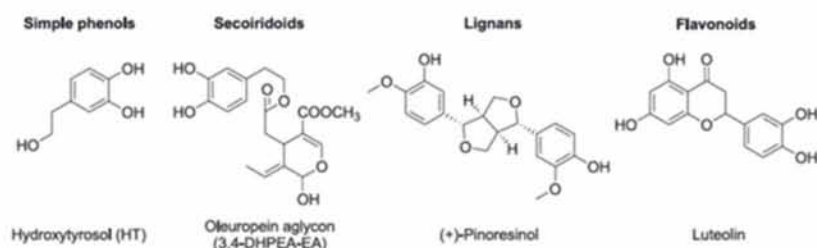
#### **3.4.1 Έλαιο: Myrolion ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών**

Η φαινολική σύσταση των ελαιολάδων διαφέρει καθώς εξαρτάται από την ποικιλία, την ηλικία των δέντρων, τις γεωργικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια, την ωρίμανση του καρπού κλπ. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε ως διεσπαρμένη ελαιώδης φάση στην οποία επιτεύχθηκε η ενθυλάκωση της Βιταμίνης D, το βιολογικό έξτρα παρθένο ελαιόλαδο Myrolion το οποίο διαθέτει ισχυρισμό υγείας, λόγω της υψηλής του συγκέντρωσης σε φαινολικά συστατικά. Συγκεκριμένα, το Myrolion περιέχει 124 mg/Kg ελαιοακανθάλη, 72 mg/Kg ολεασίνη, 31 mg/Kg ελευρωπαΐνη (μορφή μονοαλδεΐδης), 104 mg/Kg παράγωγα υδροξυτυροσόλης, ενώ τα συνολικά παράγωγα τυροσόλης είναι 146 mg/Kg. Τα οφέλη από την κατανάλωση ελαιολάδου είναι γνωστά από την αρχαιότητα και στις μέρες μας, μέσα από πληθώρα μελετών, η κατανάλωσή του έχει συνδεθεί με μακροζωία και μείωση του κινδύνου εμφάνισης διάφορων παθήσεων και θνησιμότητας.

Τα οφέλη αυτά, παραδοσιακά αποδίδονται στο υψηλό του περιεχόμενο σε ελαιϊκό οξύ. Ωστόσο, έχει πλέον αποδειχθεί ότι αυτές οι επιδράσεις πρέπει επίσης να αποδοθούν στο φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου (Granados-Principal, Quiles, Ramirez-Tortosa, Sanchez-Rovira, & Ramirez-Tortosa, 2010), (Omar, 2010) το οποίο διαθέτει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδης και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Μάλιστα για ορισμένες δράσεις των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου, τα στοιχεία είναι ήδη αρκετά ισχυρά ώστε να καταστήσουν δυνατή την νόμιμη χρήση των ισχυρισμών

υγείας για τα τρόφιμα.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα σχετίζεται με την πρόληψη ασθενειών που επάγονται από το οξειδωτικό στρες όπως η στεφανιαία καρδιακή νόσος (CHD), ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις καθώς επίσης η γήρανση και οι επιπτώσεις της στον οργανισμό (Li, Ishdorj, & Gibson, 2012), (Lönn, Dennis, & Stocker, 2012), (Wang & Bennett, 2012). Επίσης, οι φαινόλες είναι ικανές να τροποποιήσουν τη γονιδιακή έκφραση, επηρεάζοντας τα γονίδια και την πρωτεϊνική έκφραση και συνεπώς την παραγωγή των μεταβολιτών (Martín-Peláez, Covas, Fitó, Kušar, & Pravst, 2013).



**EIKONA 8.** Κύριες τάξεις φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου (OOPC)  
(Martín-Peláez, Covas, Fitó, Kušar, & Pravst, 2013)

Συγκεκριμένα, το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου έχει αποδειχτεί ότι παρέχει προστασία ενάντια του οξειδωτικού στρες και των φλεγμονών, οι οποίες εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών χρόνιων εκφυλιστικών παθολογιών όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος ή οι ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση. Η προστασία ή/και θεραπεία έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το εγκεφαλικό επεισόδιο και ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος επιτυγχάνονται λόγω της μείωσης στην οξειδωμένη μορφή της χοληστερόλης LDL η οποία αποτελεί την αιτία όλων αυτών, μέσω της λήψης πολυφαινολών. Έρευνες έχουν δείξει μείωση της LDL με λήψη ηλιελαίου εμπλουτισμένο με υδροξυτυροσώλη (Vázquez-Velasco et al., 2011), η οποία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες φαινολικές ουσίες που περιέχει το συγκεκριμένο ελαιόλαδο που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον, μέσω επιδημιολογικών μελετών έχει αποδειχθεί ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου μειώνεται όσο αυξάνεται η βρώση ελαιολάδου, κάτι που θεωρείται ότι οφείλεται στην επίδραση των πολυφαινολών στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής του οργανισμού, στην κατάσταση φλεγμονής και στις κυτταρικές λειτουργίες. Μελέτες *in vitro* και *in vivo* αποκαλύπτουν την προστασία που αυτές προσφέρουν έναντι της οξείδωσης του DNA. Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσώλη σε συγκεντρώσεις 0.1-50  $\mu\text{M}$  μειώνουν τη φλεγμονώδη αγγειογένεση στον ανθρώπινο ιστό (Scoditti et al., 2012). Ένα ακόμα



πλεονέκτημα των πολυφαινολών, αποτελεί η εξαιρετική νευροπροστασία που προσφέρουν, παρουσιάζοντας ευεργετικές επιδράσεις στην μνήμη και την ικανότητα μάθησης οι οποίες πλήττονται εξαιτίας της γήρανσης και διάφορων ασθενειών. Τέλος, παρουσιάζουν θετικές επιδράσεις και στην ανθρώπινη μικροχλωρίδα, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη λειτουργία του οργανισμού. Έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν επιλεκτικά την ανάπτυξη ευεργετικών βακτηρίων του εντέρου, όπως ο λακτοβάκιλος (Landete, Curiel, Rodríguez, de las Rivas, & Muñoz, 2008) τα οποία σύμφωνα με έρευνες επηρεάζουν τον μεταβολισμό των λιπιδίων και τα επίπεδα της χοληστερόλης (Martínez et al., 2009). Συγκεντρωτικά, οι διάφοροι μηχανισμοί δράσης των φαινολικών ενώσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2** (βλ. Ενότητα «Πίνακες»-Παράρτημα Ι) (Shahidi, 2012).

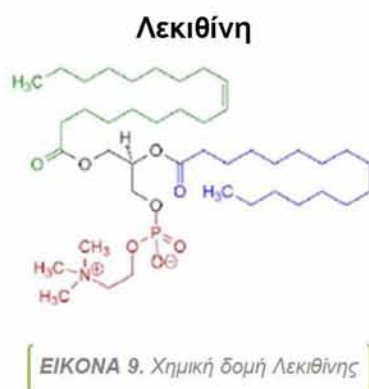
### **3.4.2 Επιφανειοενεργές ουσίες: Λεκιθίνη και Tween 20**

Ως επιφανειοενεργά για τον σχηματισμό των νανογαλακτωμάτων επιλέχθηκαν η Λεκιθίνη σόγιας και η Μονολαυρική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Tween 20). Η λεκιθίνη μάλιστα, εκτός από την βοήθεια που προσφέρει στην ομογενοποίηση του συστήματος, παρέχει επίσης και οφέλη στον οργανισμό.

Ο όρος επιφανειοενεργό, αναφέρεται σε αμφίφιλα μόρια τα οποία εμφανίζουν δύο περιοχές διαφορετικής πολικότητας, μία υδρόφιλη, πολική κεφαλή που προσανατολίζεται προς την υδατική φάση και μία υδρόφοβη, μη πολική ουρά, στραμμένη προς την ελαιώδη φάση του συστήματος διασποράς. Σκοπός των ουσιών αυτών, είναι η επίτευξη της διασποράς των δύο φάσεων, της ελαιώδους και της υδατικής, μέσω της αύξησης της μεσεπιφάνειας μεταξύ των δύο υγρών, λόγω της μείωσης της επιφανειακής τάσης. Ανάλογα με το αν η κεφαλή του μορίου διαθέτει φορτίο, οι επιφανειοενεργές ουσίες μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: α) τα μη ιοντικά, των οποίων η πολική κεφαλή δεν διαθέτει φορτίο και β) τα ιοντικά που η πολική κεφαλή τους έχει φορτίο. Η δεύτερη κατηγορία, διαχωρίζεται στις εξής περαιτέρω υποκατηγορίες (Hines et al, 1997), i) ανιονικά επιφανειοενεργά (anionic), με αρνητικά φορτισμένη κεφαλή, ii) κατιοντικά επιφανειοενεργά (cationic), των οποίων η κεφαλή είναι θετικά φορτισμένη και τέλος iii) αμφοτεριονικά επιφανειοενεργά (zwitterionic), με την πολική κεφαλή να διαθέτει θετικά και αρνητικά φορτία.

Για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων απαιτείται σύσταση επιφανειοενεργής

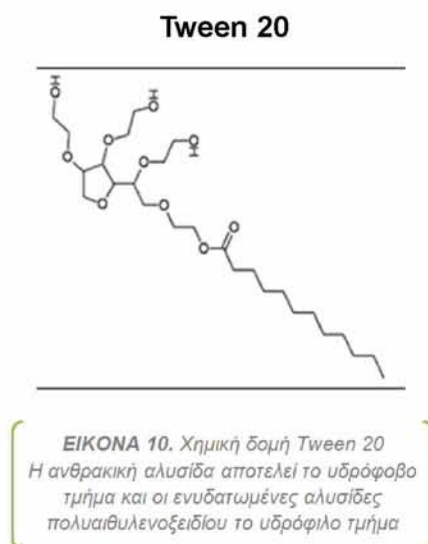
ουσίας 5-10%w/w. (Chatzidaki et al., 2016) και οφείλουμε να κάνουμε προσεκτική επιλογή, ώστε να καταλήξουμε σε ένα τελικό προϊόν με τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τις κατάλληλες για τη χρήση που προορίζεται ιδιότητες. Προκειμένου ένα επιφανειοενεργό να θεωρείται αποτελεσματικό, πρέπει να προσροφάται γρήγορα στην διεπιφάνεια ελαίου νερού και να μειώνει επαρκώς την επιφανειακή τάση.



Ως λεκιθίνη, αναφέρονται τα μίγματα των φωσφολιπιδίων που λαμβάνονται από πηγές όπως το αυγό, η σόγια κ.α. Διαλύεται πολύ καλά στα έλαια και χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας (φαρμακοβιομηχανία, τρόφιμα, κοσμητολογία), τόσο λόγω των ιδιοτήτων που την καθιστούν ιδανική ως επιφανειοενεργό, όσο και για των εμπλουτισμό των προϊόντων και την αύξηση της βιολογικής τους αξίας. Ανήκει στην κατηγορία των αμφοτεριονικών επιφανειοενεργών καθώς περιέχει δύο μακρές υδρόφοβες αλυσίδες και μια αμφοτεριονική κεφαλή (Shinoda, Shibata, & Lindman, 1993). Το υδρόφοβο τμήμα της λεκιθίνης αποτελείται από λιπαρά οξέα. Το υδρόφιλο τμήμα της (πολική κεφαλή) είναι η φωσφορική ομάδα που έχει αρνητικό φορτίο, και η ομάδα του αζώτου με τις μεθυλομάδες, που έχει θετικό φορτίο. Αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο επιφανειοενεργό λόγω του ότι τείνει να έχει κυλινδρικό σχήμα, με αποτέλεσμα τα συσσωματώματά της να σχηματίζουν εύκολα στοιβάδες, γεγονός που ευνοεί των σχηματισμό μικκυλίων.

Ως επιφανειοενεργό, η λεκιθίνη, βοηθάει στην γαλακτωματοποίηση και τον εγκλωβισμό βιοδραστικών και φαρμακευτικών ουσιών σε νανοφορείς, παρασκευάζοντας μικρογαλακτώματα με μικρό μέγεθος σταγόνων και αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα των ενθυλακωμένων ουσιών. Επιπλέον, έχει δράση ως παράγοντας ενυδάτωσης και ως φορέας σταθεροποίησης φαρμακευτικών σκευασμάτων και έχει την ικανότητα να μειώνει το ιξώδες και να ελέγχει τη ρευστότητα υλικών, να σταθεροποιεί τη σύνθεση των τροφίμων και να βοηθάει στην

Εν τούτοις, η χρήση της επεκτείνεται και πέρα από τις ιδιότητές της ως επιφανειοενεργό, λόγω του σημαντικού ρόλου της στον οργανισμό. Η λεκιθίνη, είναι εξαιρετικής σημασίας για τον μεταβολισμό αφού αποτελεί το βασικότερο συστατικό των βιολογικών μεμβρανών και παίζει συγκεκριμένους ρόλους στην ορμονική σηματοδότηση και μεταφορά. Τα λιπαρά μακρο-θρεπτικά στοιχεία (macronutrients) χρησιμεύουν ως δότες ενέργειας και φορείς λιποδιαλυτών βιταμινών. Έτσι λοιπόν, η λεκιθίνη χρησιμοποιείται και για τον εμπλουτισμό τροφίμων με φωσφολιπίδια, αποτελώντας μία σημαντική πηγή χολίνης (Schuh, Bruxel, & Teixeira, 2014).

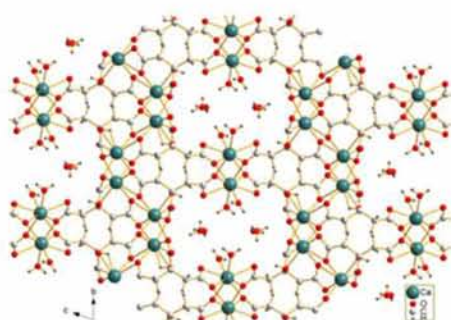


32



### 3.4.3 Υδατική φάση: υδατικό διάλυμα κιτρικού ασβεστίου

Η σύσταση της υδατικής φάσης είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η προσθήκη άλλων ουσιών σε αυτή, όπως σάκχαρα, γλυκερόλη ή άλατα, είναι ικανή να προκαλέσει αλλαγές στις φυσικοχημικές της ιδιότητες, με συνέπεια την μεταβολή των χαρακτηριστικών του τελικού νανογαλακτώματος (επιφανειακή τάση, διεπιφανειακές ιδιότητες ελαίου-νερού, μέγεθος των σταγονιδίων) (Department of Science and Engineering of Oxide Materials and Nanomaterials, Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, University Politehnica of Bucharest, 2016). Παρόλα αυτά, στην παρούσα εργασία, προστέθηκε στην υδατική φάση άλας κιτρικού ασβεστίου, προκειμένου να εξασφαλίσουμε την παρουσία του ασβεστίου και να έχουμε ως αποτέλεσμα ένα ολοκληρωμένο τελικό προϊόν.

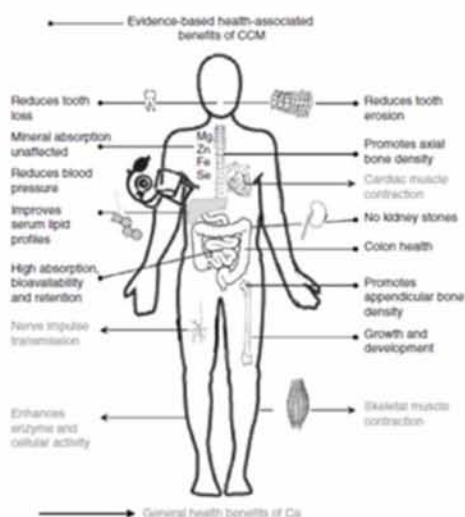


**ΕΙΚΟΝΑ 11.** Χημική δομή Κιτρικού ασβεστίου  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium\\_citrate](https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_citrate)

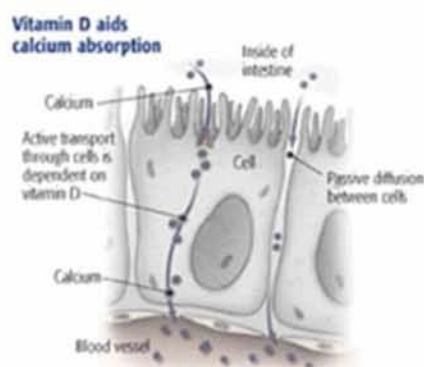
Το κιτρικό ασβέστιο, είναι το άλας ασβεστίου του κιτρικού οξέος και χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων, ως προσθετικό, όπως επίσης και σε ορισμένα συμπληρώματα διατροφής. Το ασβέστιο που χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα, διατίθεται από μεγάλη ποικιλία πηγών και μπορεί να χορηγηθεί με διάφορους τρόπους, ωστόσο οι λόγοι που επιλέγεται το συγκεκριμένο άλας είναι η καλύτερη διαλυτότητα που έχει στο νερό, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα άλατα ασβεστίου (πχ ανθρακικό), η αυξημένη του βιοδιαθεσιμότητα στον οργανισμό και το γεγονός ότι είναι πιο εύπεπτο. Επιπλέον, ανήκει στις οικονομικές επιλογές.

Είναι γενικά αποδεκτή η σημασία του ασβεστίου στον οργανισμό και η αναγκαιότητα της επαρκούς πρόσληψής του, καθώς συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες, τόσο σκελετικές, όσο και μη σκελετικές. Οι σκελετικές λειτουργίες του ασβεστίου μπορούν να διακριθούν σε και είναι εξαιρετικά σημαντικό για την ανάπτυξη ενός υγιούς σκελετού ο οποίος είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της υγείας του ανθρώπου. Επίσης συμβάλλει στην υγεία των δοντιών και στην πρόληψη της οστεοπόρωσης και των καταγμάτων που προκαλούνται από πτώσεις. Επιπλέον,

το ασβέστιο είναι ένα ιχνοστοιχείο απαραίτητο για την εύρυθμη λειτουργία σχεδόν όλων των κυττάρων στο σώμα, ακόμα και για μη σκελετικές λειτουργίες όπως η συστολή των μυών, η νευροδιαβίβαση, η μεταγωγή σήματος, η αγγειακή λειτουργία κ.α. Συνεπώς, μία σταθερή επάρκεια ασβεστίου, είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ισορροπίας του στους ιστούς, αλλά και την αποφυγή της μείωσης της οστικής πυκνότητας, που έχει ως αποτέλεσμα έναν εύθραυστο σκελετό με αυξημένη πιθανότητα καταγμάτων (Reinwald, Weaver, & Kester, 2008).



**EIKONA 12.** Οφέλη υγείας Ασβεστίου (Reinwald, Weaver, & Kester, 2008)



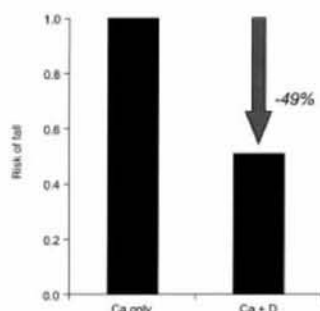
**EIKONA 13.** Απορρόφηση Βιταμίνης D και Ασβεστίου <https://www.health.harvard.edu/staying-healthy/what-you-need-to-know-about-calcium>

Ωστόσο, στους περισσότερους ενήλικες/ηλικιωμένους είναι απαραίτητη η λήψη συμπληρωμάτων προκειμένου να επιτευχθεί η επαρκής συγκέντρωση ασβεστίου στον οργανισμό. Στις μέρες μας, μέσα από πληθώρα μελετών, έχει αποδειχθεί ότι οι αμφίδρομες ροές ασβεστίου μεταξύ του αίματος και των οστών διαμεσολαβούνται από την παραθυρεοειδή ορμόνη (PTH) και τη βιταμίνη D ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ) (Reinwald et al., 2008). Συγκεκριμένα η Βιταμίνη D, διεγείρει την αύξηση των επιπέδων του κυκλοφορούντος ασβεστίου, μέσω της αύξησης της απορρόφησης του εντερικού ασβεστίου και της επαναρρόφησης του ασβεστίου των νεφρών.

Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι ο συνδυασμός Βιταμίνης D και ασβεστίου, ενισχύει την αποτελεσματικότητά τους ως προς την μείωση των καταγμάτων που προκαλούνται από πτώση, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα (**Διάγραμμα 1**) (Michael F. Holick, 2006). Είναι λοιπόν εμφανής η ανάγκη ύπαρξης συμπληρωμάτων που θα περιέχουν ταυτόχρονα τις συνιστώμενες δόσεις τόσο για το Ασβέστιο, όσο και για τη Βιταμίνη D και για αυτό, κρίθηκε απαραίτητος ο



συνδιασμός των δύο αυτών ουσιών, ώστε να καταλήξουμε σε ένα ολοκληρωμένο συμπλήρωμα διατροφής.



**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1.** Σε σχέση με τη θεραπεία με 1200 mg / d ασβεστίου για 12 εβδομάδες, η ημερήσια θεραπεία με 800 IU βιταμίνης D σε συνδιασμό με 1200 mg ασβεστίου οδήγησε σε μείωση κατά 49% του σχετικού κινδύνου πτώσης στις μεγαλύτερες γυναίκες (μέση ηλικία, 85,3 έτη) μακροχρόνια. Ca = ασβέστιο; Ca + D = Ca συν βιταμίνη D.  
(Michael F. Holick, 2006)

### 3.4.4 Βιοδραστική ουσία προς ενθυλάκωση: Βιταμίνη D3

Παρά το γεγονός ότι είναι ευρέως γνωστή ως βιταμίνη, στην πραγματικότητα η Βιταμίνη D είναι ένα μίγμα στεροειδών παραγώγων, που μετατρέπονται στην βιολογικά ενεργή ορμονική μορφή τους μετά από υδροξυλιώσεις, όπως είδαμε και στο Κεφάλαιο 2.1. Τόσο η χοληκαλσιφερόλη (D<sub>3</sub>), όσο και η εργοκαλσιφερόλη (D<sub>2</sub>) έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3** (βλ. Ενότητα «Πίνακες»-Παράρτημα Ι) (Hewavitharana & Gomes, 2016) και βρίσκονται σε μορφή λευκής κρυσταλλικής σκόνης.

Ωστόσο, μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η χολοκαλσιφερόλη είναι βιολογικά πιο δραστική από την εργοκαλσιφερόλη και απορροφάται καλύτερα από το έντερο, καθώς έχει βρεθεί ότι η ενεργή μορφή της έχει μεγαλύτερη συγγένεια με την πρωτεΐνη πρόσδεσης της Βιταμίνης D, η οποία την μεταφέρει στους υποδοχείς της (Hewavitharana & Gomes, 2016). Επιπλέον, η χοληκαλσιφερόλη είναι σταθερότερη προς οξείδωση και για αυτόν τον λόγο αποτελεί την κοινή μορφή που καταναλώνεται ως συμπλήρωμα Βιταμίνης D και επιλέχθηκε και στην παρούσα εργασία προς ενθυλάκωση.

Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανάπτυξη βιοσυμβατών Ο/Ν νανογαλακτωμάτων για την ενθυλάκωση κατάλληλης ποσότητας Βιταμίνης D, ώστε μία δόση να καλύπτει την ημερήσια συνιστώμενη πρόσληψη που είναι 400-600 IU (Ross et al., 2011). Γίνεται εύκολα αντιληπτό, ότι η ποσότητα αυτή είναι δύσκολο να

προσληφθεί αποκλειστικά από τροφές, χωρίς την έκθεση στον ήλιο και ως εκτούτου, συχνά απαιτείται η λήψη συμπληρωμάτων. Ωστόσο η ποσότητα Βιταμίνης D που μπορεί να είναι ενσωματωμένη σε ένα σύστημα καθορίζεται κυρίως από τη μέγιστη ποσότητα που μπορεί να διαλυθεί στη λιπιδική φάση. Η χοληκαλσιφερόλη, λόγω της υψηλής λιποφιλικότητάς της, είναι εύκολα διαλυτή σε ένα ευρύ φάσμα οργανικών διαλυτών συμπεριλαμβανομένων των αλκοολών και υδρογονανθράκων, εμφανίζοντας σταθερότητα για μεγάλα χρονικά διαστήματα όταν φυλάσσεται σε απόλυτη αιθανόλη, απουσία οξυγόνου και φωτός. Επίσης είναι σταθερή σε έλαια, λίπη και εμπλουτισμένα τρόφιμα, όταν φυλάσσεται σε σκοτάδι.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, γίνεται εμφανές ότι η ενθυλάκωση, αποτελεί κατάλληλη τεχνική για τη διατήρηση και την βελτίωση των ιδιοτήτων όλων των λιποδιαλυτών βιταμινών, όπως είναι η Βιταμίνη D, καθώς την προστατεύει από την βιολογική υποβάθμιση και οξείδωση κατά την αποθήκευσή της ή κατά την αλληλεπίδραση με τα λοιπά συστατικά. Επίσης, η επιλογή των συνθηκών παρασκευής των νανογαλακτωμάτων πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή, ώστε η επιθυμητή βιοδραστική ουσία να μην υποστεί υποβάθμιση από την υψηλή πίεση ή θερμοκρασία που μπορεί να αναπτυχθούν κατά την διαδικασία (Gonnet et al., 2010).

### **3.5 Εφαρμογές νανογαλακτωμάτων**

Οι μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων, όπως το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων, η σταθερότητά τους στον χρόνο κατά την αποθήκευση και η ρυθμιζόμενη ρευστότητά τους, τα καθιστά ιδανικά συστήματα για πολλές εφαρμογές σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας, κάτι που γίνεται εμφανές από την πληθώρα μελετών, αναφορών και αιτήσεων διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας. Επίσης σημαντικό παράγοντα της επιλογής τους αποτελεί η ευκολία παρασκευής και μεταφοράς τους στη βιομηχανική κλίμακα.

Η ικανότητα των νανογαλακτωμάτων να χρησιμεύουν ως φορείς μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών, έχει μεγάλο ενδιαφέρον και για την βιομηχανία τροφίμων, καθώς τα νανογαλακτώματα χρησιμοποιούνται συχνά για τον σχεδιασμό λειτουργικών τροφίμων με νέες ιδιότητες για την ενσωμάτωση μη-υδατοδιαλυτών συστατικών (Gupta et al., 2016). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη νανοδόμηση διάφορων τροφίμων, όπως την αντικατάσταση μέρους της λιπαρής φάσης ενός τροφίμου με αποτέλεσμα τη μείωση του περιεχόμενου λίπους αλλά και

την ελάττωση του βαθμού επεξεργασίας (Mitsou et al., 2016).

Η φαρμακευτική βιομηχανία εκμεταλλεύεται τη λιπόφιλη φύση των νανογαλακτωμάτων, για τη διαλυτοποίηση αδιάλυτων στο νερό φαρμάκων, όπως επίσης τη δυνατότητα που παρέχουν για ρύθμιση του φορτίου και της ρευστότητάς τους με αποτέλεσμα την παρασκευή συστημάτων που μπορούν εύκολα να προσληφθούν από τον ασθενή. Επιπλέον, το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης στα οποία οι βιοδραστικές ουσίες ενθυλακώνονται, παρέχει προστασία κατά τη μεταφορά τους στο κύτταρο-στόχο και αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα και την απορρόφησή τους από τον οργανισμό (Erdal, Ozhan, Mat, Ozsoy, & Gungor, 2016), (Acosta, 2009). Για τους λόγους αυτούς, τα νανογαλακτώματα έχουν χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες μορφές χορήγησης φαρμάκων, συγκεκριμένα την τοπική, την οφθαλμική, την ενδοφλέβια, την ενδορινική καθώς επίσης είναι δυνατή η χορήγησή τους από του στόματος (Gupta et al., 2016).

Ο κλάδος της κοσμητολογίας έχει επίσης στραφεί προς την χρήση νανογαλακτωμάτων για την παρασκευή πιο αποτελεσματικών καλλυντικών κυρίως όσον αφορά την ιδανική διείσδυση της βιοδραστικής ουσίας στο δέρμα, το οποίο αποτελεί φυσικό φραγμό δυσκολεύοντας την απορρόφηση ουσιών λόγω της λιπόφιλης φύσης του. Για να επιτευχθεί ένα καλλυντικό αποτέλεσμα, απαιτείται κάποια διείσδυση της δραστικής ένωσης στο δέρμα, ωστόσο δεν θα πρέπει να απορροφάται περαιτέρω μετά την τοπική εφαρμογή της (Pardeike, Hommoss, & Müller, 2009). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δυνατότητα χρήσης νανογαλακτωμάτων ελαίου-σε-νερό με την οργανική φάση να αποτελείται από ένα μείγμα από έλαια με διαφορετικές μοριακές μάζες και ιδιότητες (για βέλτιστη επίδραση στο ανθρώπινο δέρμα) ως καλλυντικά προϊόντα, καθιστώντας τα αποτελεσματικότερα από τα συμβατικά (Koroleva & Yurtov, 2012). Επιπλέον, η ενθυλάκωση των βιοδραστικών ουσιών τις προστατεύει από την υποβάθμιση κατά την αποθήκευση (Yukuyama, Ghisleni, Pinto, & Bou-Chacra, 2016).

Μέχρι σήμερα, τα νανογαλακτώματα και η νανοτεχνολογία γενικότερα, έχουν απασχολήσει σε μεγάλο βαθμό την επιστημονική κοινότητα και έχουν οδηγήσει σε σημαντική πρόοδο πολλούς κλάδους της βιομηχανίας. Καθώς η χρήση νέων υλικών και η ανάπτυξη νέων μεθόδων παρασκευής συστημάτων στη νανοκλίμακα συνεχίζεται, προβλέπεται να οδηγήσει σε πληθώρα νέων εφαρμογών στους βιομηχανικούς τομείς που αναφέρθηκαν, προσφέροντας πιο εξελιγμένα συστήματα μεταφοράς, οδηγώντας σε πιο αποτελεσματικά και στοχευμένα προϊόντα.



## 4. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1 Υλικά

Ως λιπαρή φάση για την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων επιλέχθηκε το βιολογικό εξτρα παρθένο ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών Myrolion. Ως επιφανειοενεργά χρησιμοποιήθηκαν το Tween 20 για σύνθεση (Polyethoxylene 20) της εταιρίας Merck Schuchardt και η Λεκιθίνη σόγιας καθαρότητας 90% σε μορφή σκόνης (L-alpha-phosphatidylcholine) της εταιρίας Alfa Aesar. Τα δύο επιφανειοενεργά χρησιμοποιήθηκαν σε μίγμα. Είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στη βιομηχανία τροφίμων καθώς είναι βρώσιμα, μη τοξικά και βιοδιασπώμενα. Η συνεχής φάση των νανογαλακτωμάτων ήταν υδατικό διάλυμα κιτρικού ασβεστίου (Calcium citrate tetrahydrate) καθαρότητας 99% της εταιρίας Aldrich συγκέντρωσης 0.15 mM. Επίσης, αγοράστηκαν δύο συσκευασίες του 1g βιταμίνης D3 (cholecalciferol, VD3) 98% καθαρότητας, σε κρυσταλλική μορφή, από την εταιρία Sigma- Aldrich και αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη.

Τόσο η δομική μελέτη της μεσεπιφάνειας, όσο και η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των νανογαλακτωμάτων, πραγματοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας EPR. Για την δομική μελέτη, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα του ιχνηθέτη του σπιν 5-doxyl stearic acid (5-(1-οξυλ2,2-διμεθυλο-οξαζολιδινο)-στεατικό οξύ) (5-DSA), προϊόν της εταιρίας Sigma – Aldrich σε απόλυτη αιθανόλη συγκέντρωσης 7,8 mM. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μελετήθηκε με χρήση διαλύματος ρίζας 4-hydroxy-TEMPO (TEMPOL), Alfa Aesar, σε απιονισμένο νερό, συγκέντρωσης 5mM.

### 4.2 Μέθοδοι

Η μεθοδολογία και τα όργανα που θα χρησιμοποιηθούν τόσο για την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων, όσο και για τη μελέτη των χαρακτηριστικών τους είναι ουσιαστικής προκειμένου να πραγματοποιηθεί επιτυχής ανάπτυξη αποτελεσματικών φορέων ενθυλάκωσης βιοδραστικών ουσιών και να προσδιοριστούν οι δυνατότητες του συστήματος και οι τρόποι βελτιστοποίησης του. Στη συγκεκριμένη εργασία, τα νανογαλακτώματα παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ομογενοποίησης υψηλής πίεσης και η δομική τους μελέτη πραγματοποιήθηκε με την

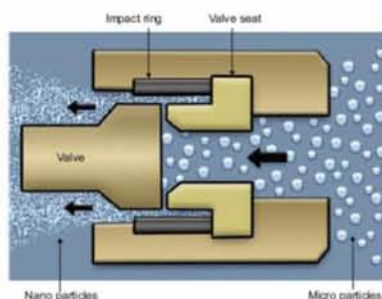
τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός και με φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού. Με τη φασματοσκοπική αυτή μέθοδο μελετήθηκε επίσης και η αντιοξειδωτική ικανότητα των συστημάτων. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά οι προαναφερθείσες μέθοδοι.

#### **4.2.1 Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (High Pressure Homogenization-HPH)**

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι παρασκευής νανογαλακτωμάτων οι οποίες χρησιμοποιούνται ανάλογα με τα υλικά του συστήματος που επιθυμούμε να παρασκευάσουμε και απο τις ιδιότητες που θέλουμε να του προσδώσουμε (πχ μέγεθος σταγόνων, ευαισθησία συστατικών). Οι μέθοδοι διακρίνονται σε μεθόδους υψηλής και σε μεθόδους χαμηλής προσφοράς ενέργειας, παρέχοντας διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (Acosta, 2009), (Tadros et al., 2004). Για τις προσεγγίσεις υψηλής ενέργειας χρησιμοποιούνται συσκευές όπως, ομογενοποιητές υψηλής πίεσης και συσκευές υπερήχων κλπ, οι οποίες είναι ικανές να παράξουν ισχυρή μηχανική ενέργεια, ώστε να προκαλέσουν ομογενοποίηση των δύο φάσεων (ελαιώδους και υδατικής) και να οδηγήσουν στο σχηματισμό σταγόνων πολύ μικρού μεγέθους (Gutiérrez et al., 2008), (Wooster, Golding, & Sanguansri, 2008). Οι τεχνικές προσφοράς υψηλής ενέργειας παρέχουν τη δυνατότητα καλύτερου ελέγχου του μεγέθους των σταγόνων της διεσπαρμένης φάσης και της σύστασης του νανογαλακτώματος. Ωστόσο, ορισμένες ουσίες μπορεί να υποστούν υποβάθμιση λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που δημιουργείται κατά την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων. Αντίθετα οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας βασίζονται στον αυθόρμητο σχηματισμό των κολλοειδών συστημάτων με απλή ανάμιξη των συστατικών τους ή και ήπια ανάδευση (Qian & McClements, 2011).

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, κατά την οποία ασκείται υψηλή πίεση σε ένα σύστημα διασποράς δύο μη αναμίξιμων υγρών, καθώς αυτό αντλείται μέσω μίας περιοριστικής βαλβίδας, μειώνοντας τη διάμετρο των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης, και οδηγώντας σε ομογενοποίηση. Η ισχυρή διατμητική πίεση έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πολύ μικρών νανοσταγονιδίων (Quintanilla-Carvajal et al., 2010), (Sanguansri & Augustin, 2006). Αρχικά, το προ-γαλάκτωμα επιθυμητής σύστασης, εισέρχεται στη βαλβίδα με σχετικά χαμηλή ταχύτητα. Στη συνέχεια δημιουργείται η πίεση από την αντλία η οποία παρέχει σχετικά σταθερό ρυθμό ροής. Το προ-γαλάκτωμα, ρέει

μεταξύ της βαλβίδας και της έδρας με μεγάλη ταχύτητα και καθώς η ταχύτητα αυξάνεται, προκαλείται παράλληλα μείωση της πίεσης μειώνεται. Τελικό αποτέλεσμα είναι η έξοδος του ομογενοποιημένου νανογαλακτώματος από το μηχάνημα (Floury, Desrumaux, Axelos, & Legrand, 2003).



ΕΙΚΟΝΑ 14. Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (HPH)

#### 4.2.2 Παρασκευή νανογαλακτωμάτων

Προκειμένου να αναπτυχθούν οι υγρές νανοδιασπορές τύπου νανογαλακτωμάτων ελαίου-σε-νερό (O/W), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, ώστε να επιτευχθεί η διαλυτοποίηση και ενθυλάκωση της Βιταμίνης D στα σταγονίδια της ελαιώδους φάσης και η επιτυχής ανάμιξη των δύο φάσεων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο ομογενοποιητής PandaPLUS 1000 της εταιρίας GEA, καθώς μας ενδιέφερε η ανάπτυξη νανογαλακτώματος με μικρό μέγεθος σταγόνων (dm 180-250 nm), κάτι που απαιτεί υψηλή ενέργεια για να επιτευχθεί (Tadros et al., 2004). Η υψηλή πίεση είναι απαραίτητη για το σχηματισμό μικρού μεγέθους νανοσταγονιδίων, το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα δομικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος αλλά επίσης καθορίζει την σταθερότητά του. Αύξηση της πίεσης ομογενοποίησης, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της διαμέτρου των σταγόνων (Acosta, 2009), (D. J. McClements et al., 2007).

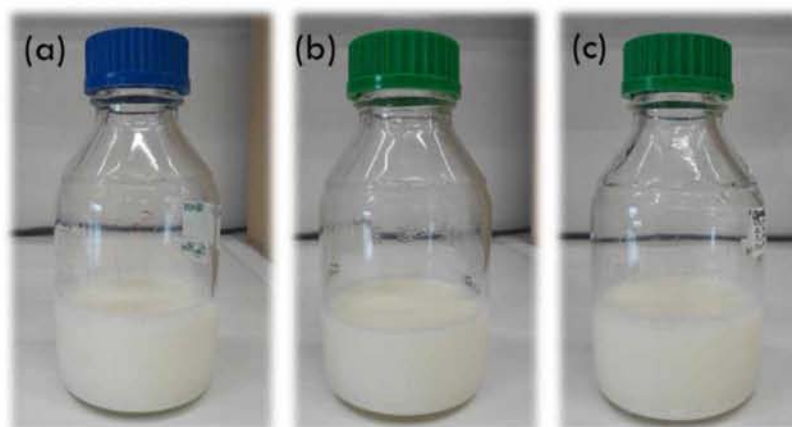
Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για παρασκευές συστημάτων με διάφορες συγκεντρώσεις αρκετών συστατικών, συνδιασμοί των οποίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Ωστόσο, λόγω σταθερότητας, το σύστημα που αναπτύχθηκε τελικά ήταν το S1 όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Ακολούθως, έγινε προσθήκη άλατος κιτρικού ασβεστίου στην υδατική φάση προκειμένου να ολοκληρωθεί η παρασκευή του προτεινόμενου συστήματος. Παρόλο που αυτό επηρέασε την σταθερότητα του συστήματος όπως θα



παρουσιαστεί στα αποτελέσματα παρακάτω (14 μέρες), αυτή παρέμεινε αρκετά ικανοποιητική.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΚΥΚΛΟΙ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ (ΗΜΕΡΕΣ)
Tween 20/Λεκιθίνη σόγιας/ Ελαιόλαδο/ Νερό	5	90
	7	90
<b>Tween 20/Λεκιθίνη σόγιας/ Ελαιόλαδο/ Νερό (S1)</b>	<b>12</b>	<b>90</b>
Q-Nature/Λεκιθίνη σόγιας/ Ελαιόλαδο/ Νερό	5	10
	10	10
	12	7
Labrasol/Λεκιθίνη σόγιας/ Ελαιόλαδο/ Νερό	10	8

Ελαιόλαδο/ Tween 20/ Λεκιθίνη σόγιας/ υδατικό διάλυμα κιτρικού ασβεστίου (άδειο- S1): παρασκευάστηκαν προ-γαλακτώματα αποτελούμενα από τα επιμέρους συστατικά, ώστε αυτά να ενσωματωθούν μερικά μέσω μηχανικής ανάδευσης, σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά, το ελαιόλαδο αναμιγνύεται με κατάλληλη ποσότητα Tween 20 και λεκιθίνης διαλυμένης σε ελαιόλαδο και ακολουθεί η προσθήκη της υδατικής φάσης ώστε να σχηματιστεί νανοδιασπορά επιθυμητής σύστασης. Στη συνέχεια, το προγαλάκτωμα, υπόκειται σε ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (660-700 bar) για 12 κύκλους, προκειμένου να επιτευχθεί η τελική νανοδιασπορά απουσία ή παρουσία της Βιταμίνης D.



**ΕΙΚΟΝΑ 15.** Φωτογραφίες (α) Άδειο νανογαλάκτωμα  
(b) Γεμάτο νανογαλάκτωμα με ενσωματωμένη Βιταμίνη D στο ελαιόλαδο  
(c) Γεμάτο νανογαλάκτωμα με εξατμισμένη αιθανόλη

#### 4.2.2.1 Ενθυλάκωση βιταμίνης D

Έγινε προσπάθεια ενθυλάκωσης της Βιταμίνης D στα νανογαλακτώματα με δύο πιθανούς τρόπους, α) με ενσωμάτωσή της στη λιπαρή φάση (ελαιόλαδο) και β) με παρασκευή διαλύματος της βιταμίνης σε απόλυτη αιθανόλη και εξάτμιση.

α) Ελαιόλαδο με Βιταμίνη D/ Tween 20/ Λεκιθίνη σόγιας/ υδατικό διάλυμα κιτρικού ασβεστίου (γεμάτο- SA): Για την παρασκευή νανογαλακτώματος με την πρώτη μέθοδο, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη της Βιταμίνης D με το ελαιόλαδο, προς δημιουργία διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης (0,002g Βιταμίνης D σε 20g ελαιολάδου) και στη συνέχεια παρασκευάστηκε το γεμάτο νανογαλακτώμα, όπως αναφέρεται παραπάνω χρησιμοποιώντας ως λιπαρή φάση το μίγμα ελαιολάδου/βιταμίνης.

β) Ελαιόλαδο/ Tween 20/ Λεκιθίνη σόγιας/ υδατικό διάλυμα κιτρικού ασβεστίου (γεμάτο- SB): Για την ενθυλάκωση της Βιταμίνης D με τον δεύτερο τρόπο, παρασκευάστηκε διάλυμά της σε απόλυτη αιθανόλη (0,002g Βιταμίνης D σε 2mL αιθανόλης) από το οποίο προσθέσαμε 0,5mL σε φιάλη με βιδωτό πώμα. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε άδειο νανογαλακτώμα όπως προαναφέρθηκε και ακολούθως προστέθηκε στη φιάλη όπου παρέμεινε η Βιταμίνη D, μετά την εξάτμιση της αιθανόλης. Η λογική αυτής της μεθόδου είναι ότι εφόσον η βιοδραστική ουσία είναι λιπόφιλη, όταν βρεθεί σε ένα περιβάλλον με υδρόφιλη και λιπόφιλη φάση, θα αναζητήσει τα λιπόφιλα νανοσταγονίδια και θα εισαχθεί σε αυτά (SB).

#### 4.2.2.2 Προσθήκη ασβεστίου

Για την παρασκευή ενός ολοκληρωμένου προϊόντος, με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, ήταν απαραίτητη η προσθήκη Ασβεστίου στο τελικό νανογαλακτώμα. Αυτό, επιτεύχθηκε με ενσωμάτωσή του στην υδατική φάση του συστήματος. Ζυγίστηκαν 0,002g κιτρικού ασβεστίου και προστέθηκαν σε 230g απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αυτό αποτέλεσε την υδατική φάση του νανογαλακτώματος, το οποίο παρασκευάστηκε όπως προαναφέρθηκε με ανάμιξη των επιθυμητών συστατικών και χρήση ομογενοποιητή υψηλής πίεσης.

### 4.2.3 Δομική μελέτη

#### 4.2.3.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering- DLS)

Η μέθοδος αυτή, παρέχει μία εκτίμηση της δομής του νανογαλακτώματος, προσδιορίζοντας το μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης, της κατανομής (Pdl) αλλά και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (Fanun, Papadimitriou, & Xenakis, 2011), (Theochari et al., 2017), (Chatzidaki et al., 2016). Οι μετρήσεις με DLS πραγματοποιήθηκαν παρουσία και απουσία της Βιταμίνης D στα νανογαλακτώματα, απευθείας μετά την παρασκευή τους αλλά και σε διάφορες χρονικές στιγμές, παρέχοντας πληροφορίες για τη σταθερότητα των συστημάτων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το όργανο Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) εξοπλισμένο με το λέιζερ He-Ne στερεάς κατάστασης ( $\lambda=633$ ) και την πατενταρισμένη μη επεμβατική τεχνολογία backscatter (NIBS), της εταιρίας Malvern Instruments (UK). Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε τριπλές σε θερμοκρασία 25°C και σε γωνία σκέδασης 173°. Ο υπολογισμός των υδροδυναμικών ακτίνων των διεσπαρμένων μικυλίων επιτεύχθηκε με τη χρήση της εξίσωσης Stokes-Einstein:

$$R_H = k_B T / 6\pi\eta D$$

Όπου:

- $k_B$  είναι η σταθερά του Boltzman
- $T$  είναι η απόλυτη θερμοκρασία
- $\eta$  είναι το ιξώδες της συνεχούς φάσης σε δεδομένη θερμοκρασία
- $D$  είναι η σταθερά διάχυσης

(Hassan, Rana, & Verma, 2015)

#### 4.2.3.2 Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electronic Paramagnetic Resonance Spectroscopy- EPR)

Η δυναμική και η πολικότητα της μονοστιβάδας των επιφανειοενεργών μεταξύ της διεσπαρμένης και της συνεχούς φάσης των νανοδιασπορών, πραγματοποιήθηκε με τη φασματοσκοπική μέθοδο του Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR), η οποία βασίζεται στην απορρόφηση ακτινοβολίας από μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια.

Για να προετοιμαστούν τα δείγματα προς μέτρηση, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, προκειμένου να εισαχθεί η κατάλληλη ποσότητα του ιχνηθέτη



5-doxyl-stearic acid (5-DSA) στα νανογαλακτώματα. Αρχικά, παρασκευάστηκε stock διάλυμα του ιχνηθέτη 5-DSA σε απόλυτη αιθανόλη συγκέντρωσης 7,8 mM, από το οποίο προστέθηκαν 15μL σε erpendorf. Αφού η αιθανόλη εξατμίστηκε, προστέθηκε σε κάθε erpendorf 1mL δείγματος και παρέμεινε 1 ημέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε ο ιχνηθέτης να μεταφερθεί στην επιφάνεια των μεμβρανών. Στη συνέχεια, τα δείγματα εισήχθησαν σε επίπεδη κυψελίδα χαλαζία και καταγράφηκαν τα φάσματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με το όργανο Bruker EMX EPR, ρυθμισμένο με τις εξής παραμέτρους: center field 0.349 T, scan range 0.01 T, receiver gain  $5.64 \times 10^3$ , time constant 5.12 ms, modulation amplitude 0.4 mT, frequency 9.78 GHz. Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν και από αυτά προέκυψαν η παράμετρος S και ο χρόνος ιδιοπεριστροφής  $\tau_R$ , με χρήση των παρακάτω εξισώσεων.

#### Παράμετρος S:

$$S = \frac{(A_{||} - A_{\perp})}{[A_{ZZ} - 1/2(A_{XX} + A_{YY})](\alpha_{No}/\alpha_N)}$$

Όπου:

- $A_{XX}$ ,  $A_{YY}$  και  $A_{ZZ}$  είναι οι τιμές κρυστάλου (single crystal values) του ιχνηθέτη spin με τιμές 6.3 G, 5.8 G και 33.6 G, αντίστοιχα
- $A_{||}$  είναι το μισό της απόστασης των εξωτερικών γραμμών
- $A_{\perp}$  θεωρείται ως η μισή απόσταση των εσωτερικών γραμμών (Griffith & H., 1976)
- $\alpha_{No}/\alpha_N$  είναι ο συντελεστής διόρθωσης πολικότητας και δίνεται από την εξίσωση:

$$\alpha_{No} = \frac{1}{3}(A_{ZZ} + A_{XX} + A_{YY}) \quad \text{και} \quad \alpha_N = \frac{1}{3}(A_{||} + 2A_{\perp})$$

με το  $\alpha_{No}$  να εκφράζει την ισότροπη σταθερά του 5-DSA και το  $\alpha_N$  την ισότροπη σταθερά της μεμβράνης

Ο χρόνος ιδιοπεριστροφής  $\tau_R$ , σχετίζεται με την περιστροφική κίνηση του ιχνηθέτη spin, εκφρασμένη σε ns και υπολογίζεται από την εξίσωση (Kommareddi, O'Connor, & John, 1994):

$$\tau_R = 6 \times 10^{-10} \left[ \left( \frac{h_0}{h_{+1}} \right)^{1/2} + \left( \frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} - 2 \right] \Delta H_0$$

Όπου:

- $\Delta H_0$  είναι το πλάτος της κεντρικής κορυφής σε Tesla
- $h_{+1}$ ,  $h_0$  και  $h_{-1}$  είναι οι εντάσεις των χαμηλών, κεντρικών και υψηλών κορυφών πεδίου, αντίστοιχα

Η λήψη και επεξεργασία των δεδομένων, πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος Bruker WinEPR acquisition and processing και ακολούθησε προσομοίωση των ληφθέντων φασμάτων με το πρόγραμμα MATLAB χρησιμοποιώντας την εργαλειοθήκη Easy Spin for EPR, ώστε να ερμηνευτούν τα αποτελέσματα.

#### 4.2.4 Αντιοξειδωτική μελέτη

Η φασματοσκοπία του Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR), χρησιμοποιείται επίσης και για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστημάτων απουσία και παρουσία των ενθυλακωμένων ουσιών με χρήση κατάλληλης μεθοδολογίας που βασίζεται στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών. Μετά την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα παρουσία και απουσία της Βιταμίνης D, με χρήση της ρίζας 4-hydroxy-TEMPOL.

Αρχικά, παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα της ρίζας (1mM) και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για την λήψη φάσματος, το οποίο αποτελείται από τρεις κορυφές και αποτέλεσε το πρότυπο προκειμένου να υπολογιστεί στην συνέχεια η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων, καθώς η ένταση του σήματός της, μειώνεται παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών. Ακολούθως, 0,9 mL TEMPOL αναμίχθηκαν με 0,1 mL του εκάστοτε συστήματος και μεταφέρθηκαν άμεσα σε κυψελίδα EPR για ανάλυση και πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων κάθε 5 min για 30 min προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει μεταβολή της έντασης του σήματος. Για την λήψη των επιθυμητών φασμάτων, οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν στις εξής τιμές: center field 0.349 T, receiver gain  $4.48 \times 10^3$ , time constant 1.28 ms, conversion time 5.00 ms modulation amplitude 0.4 mT, frequency 9.78 GHz. Η % αντιοξειδωτική ικανότητα των φασμάτων EPR υπολογίστηκε μέσω του τύπου:  $\text{Αντιοξειδωτική ικανότητα} = (A_0 - A / A_0) \times 100$ , όπου ως  $A_0$  εκφράζεται το εμβαδόν του ολοκληρώματος του φάσματος του πρότυπου διαλύματος της ρίζας TEMPOL και A το εμβαδόν του ολοκληρώματος του φάσματος που λαμβάνεται παρουσία δείγματος σε κάθε χρονική στιγμή. Για κάθε σύστημα πραγματοποιήθηκε τριπλέτα μετρήσεων.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1 Δομική μελέτη νανογαλακτώματος

Το σύστημα που τελικά επιλέχθηκε για ανάπτυξη και μελέτη, όπως επίσης και για την ενθυλάκωση της Βιταμίνης D, αποτελείται από τα παρακάτω συστατικά:

- **Έλαιο (Oil):** 2% Βιολογικό έξτρα παρθένο ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων Myrolion (δισπαρμένη φάση)
- **Επιφανειοενεργά (Surfactants):** 4% Tween 20 και 2% Λεκιθίνη σόγιας διαλυμένη στο ελαιόλαδο με αναλογία 1:4 κ.β.
- **Υδατική φάση (Aqueous phase):** 92% Υδατικό διάλυμα κιτρικού ασβεστίου συγκέντρωσης 15μM (συνεχής φάση)

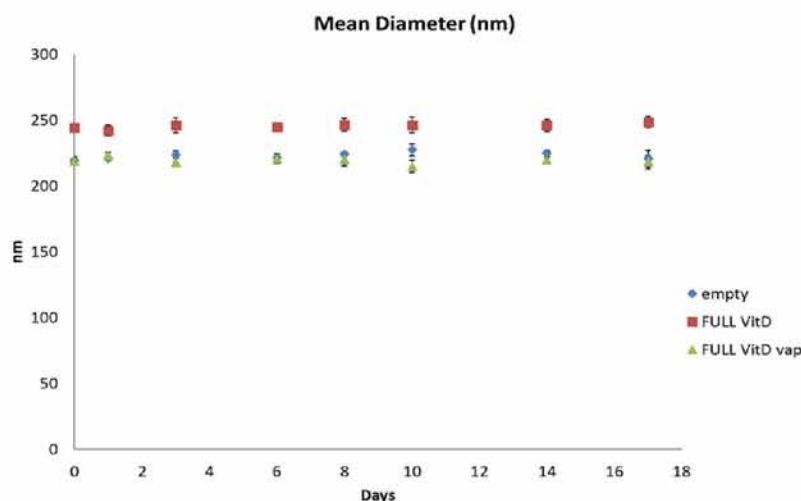
Για την παρασκευή τόσο των άδειων, όσο και των γεμάτων νανογαλακτωμάτων, χρειάστηκε αρχικά μηχανική ανάδευση και στη συνέχεια 12 κύκλοι ομογενοποίησης σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) αμέσως μετά την παρασκευή των συστημάτων, αλλά και ανά τακτά χρονικά διαστήματα για να εξεταστεί η συμπεριφορά τους κατά την αποθήκευση. Επίσης, με χρήση Φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR), μελετήθηκε η δυναμική της μεσεπιφάνειας (μονοστιβάδα επιφανειοενεργών) ώστε να διερευνηθεί η ενθυλάκωση της βιταμίνης στα σταγονίδια του ελαιολάδου, με χρήση του 5-DSA ως ιχνηθέτη. Τέλος, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των συστημάτων χρησιμοποιώντας την ελεύθερη ρίζα TEMPOL. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναλύονται στην συνέχεια.

#### 5.1.1 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Προκειμένου να εξεταστεί η διάμετρος των νανοσταγόνων, η ομοιομορφία των συστημάτων αλλά και η σταθερότητά τους στην πάροδο του χρόνου, πραγματοποιήθηκε μελέτη Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), παρουσία και απουσία Βιταμίνης D.

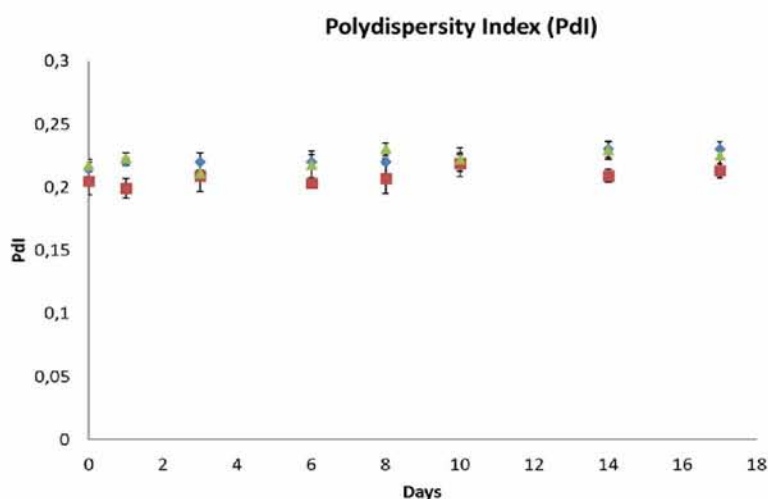
Όπως φαίνεται και από τα παρακάτω διαγράμματα, και τα τρία συστήματα παρέμειναν σταθερά για 18 ημέρες, χωρίς να υπάρξουν σημαντικές μεταβολές στη διάμετρο των νανοσταγόνων και στον δείκτη πολυδιασποράς (Pdl), ο οποίος

αντιπροσωπεύει την ομοιομορφία της κατανομής των νανοσταγόνων. Αρχικά, το μέγεθος των νανοσταγόνων στο άδειο σύστημα ήταν  $220 \pm 6$  nm, ενώ παρατηρήθηκε αύξησή του στο  $248 \pm 4$  nm μετά την προσθήκη και ενθυλάκωση της βιταμίνης. Οι δείκτες πολυδιασποράς (Pdl) δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή ούτε μεταξύ άδειου και γεμάτων συστημάτων, ούτε στην πάροδο του χρόνου.

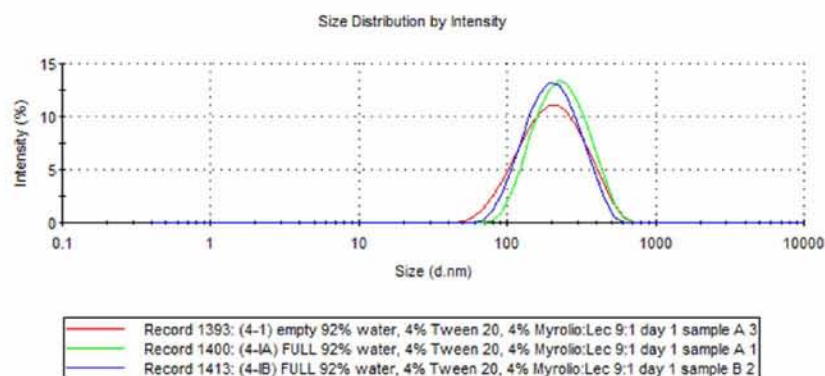


Διάγραμμα 2α. Μεταβολή της διαμέτρου των σταγονιδίων ελαίου με τον χρόνο σε σύστημα αποτελούμενο από 92% κ.β Νερό, 4% κ.β Tween20, 2% Λεκιθίνη σόγιας διαλυμένη σε ελαιόλαδο (1:4) και 2% κ.β ελαιόλαδο. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή 25°C

Τα διαγράμματα DLS δείχνουν την μέση υδροδυναμική διάμετρο των σταγονιδίων και την κατανομή των πληθυσμών κατ'όγκο. Συσχετίζουν την μέση διάμετρο τους με τον σχετικό όγκο τους. Παρέχεται έτσι μία αναλυτική κατανομή των πληθυσμών, συναρτήσει του όγκου τους στο νανογαλάκτωμα.



Διάγραμμα 2β. Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς των σταγονιδίων ελαίου με τον χρόνο σε σύστημα αποτελούμενο από 92% κ.β Νερό, 4% κ.β Tween20, 2% Λεκιθίνη σόγιας διαλυμένη σε ελαιόλαδο (1:4) και 2% κ.β ελαιόλαδο. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή 25°C.



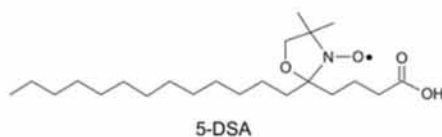
**EIKONA 16.** Καντανομή μεγεθών νανοσωματιδίων  
 (4-1) Κόκκινη γραμμή: Άδειο νανογαλάκτωμα  
 (4-IA) Πράσινη γραμμή: Γεμάτο νανογαλάκτωμα με ενσωματωμένη Βιταμίνη D στο ελαιόλαδο  
 (4-IB) Μπλέ γραμμή: Γεμάτο νανογαλάκτωμα με εξατμισμένη αιθανόλη

Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι σε όλα τα συστήματα υπάρχει ένας μοναδικός πληθυσμός νανοσταγονιδίων και τα χαρακτηρίζει αρκετά μεγάλη ομοιογένεια.

### 5.1.2 Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)- Δομή (ή Δυναμική) Μεμβράνης

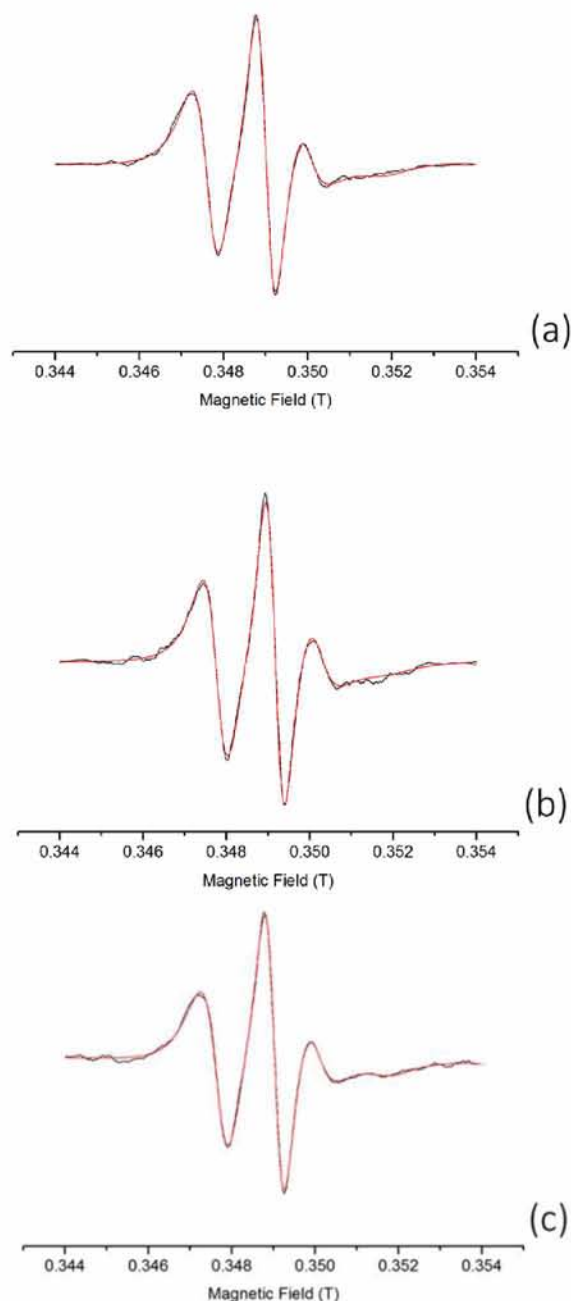
Η δομική μελέτη των νανογαλακτωμάτων, απουσία και παρουσία Βιταμίνης D συνεχίστηκε, με χρήση φασματοσκοπίας EPR και χρήση κατάλληλου ιχνηθέτη spin, προκειμένου να μελετηθούν οι ιδιότητες της διεπιφάνειας που σχηματίζει η μονοστιβάδα του επιφανειοενεργού στα νανοσταγονίδια. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης του σπιν, το επισημασμένο λιπαρό οξύ 5-DSA (**EIKONA 17**), το οποίο είναι ένα μακρύ αμφίφιλο μόριο αποτελούμενο από στεαρικό οξύ και μια λειτουργική ομάδα N-O (4,4-dimethyl-oxazolidine-N-oxyl) απευθείας συνδεδεμένη στη θέση C-5 της υδρογονανθρακικής αλυσίδας. Όταν το 5-DSA διαλυτοποιείται σε νανογαλακτώματα, εντοπίζεται στη μεσεπιφάνεια αλληλεπιδρώντας με τα μόρια του επιφανειοενεργού. Ειδικότερα, η κινητικότητα του ιχνηθέτη και η ρευστότητα της διεπιφάνειας μπορούν να εκτιμηθούν με υπολογισμό του χρόνου ιδιοπεριστροφής ( $\tau_R$ ) και της παραμέτρου S (order parameter) (Chatzidaki, Mitsou, Yaghmur, Xenakis, & Papadimitriou, 2015) που προσδιορίζονται από την ανάλυση των φασμάτων EPR.





[ ΕΙΚΟΝΑ 17. Χημική δομή 5-DSA ]

Πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος EPR του αμφίφιλου ιχνηθέτη 5-DSA αποτελούμενο από τρεις κορυφές χαρακτηριστικές των νιτροξειδίων. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα των τριών νανογαλακτωμάτων, του άδειου και των γεμάτων (ΕΙΚΟΝΑ 11), καθώς και ο πίνακας με τις τιμές των παραμέτρων  $T_R$  και  $S$  (ΠΙΝΑΚΑΣ 3).



[ ΕΙΚΟΝΑ 18. Φάσματα EPR του 5-DSA (a) άδειο νανογαλάκτωμα, (b) γεμάτο νανογαλάκτωμα με ενσωματωμένη Βιταμίνη D στο ελαιόλαδο, (c) γεμάτο νανογαλάκτωμα με εξατμισμένη αιθανόλη. Μαύρη γραμμή: πειραματικό φάσμα, Κόκκινη γραμμή: προσομοιωμένο φάσμα ]



Ο **Πίνακας 4** δείχνει τα αποτελέσματα των μετρήσεων όπως προέκυψαν από την επεξεργασία των φασμάτων, δηλαδή την παράμετρο  $S$ , που είναι ενδεικτική της ρευστότητας της μεσεπιφάνειας και τον χρόνο ιδιοπεριστροφής ( $\tau_R$ ) του ιχνηθέτη spin 5-DSA, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση που έχει η σύσταση των νανογαλακτωμάτων και η παρουσία της βιταμίνης στη δυναμική της μεσεπιφάνειας.

Από τα δεδομένα του **Πίνακα 4**, παρατηρείται μία μικρή αύξηση της παραμέτρου  $S$  στα γεμάτα νανογαλακτώματα, κάτι που υποδεικνύει μείωση ευελιξίας μεμβράνης, υποδηλώνοντας αλληλεπίδραση μεταξύ της Βιταμίνης D και του στρώματος επιφανειοενεργών ουσιών. Επίσης, στα γεμάτα νανογαλακτώματα, αυξάνεται και ο χρόνος ιδιοπεριστροφής  $\tau_R$  που αντιστοιχεί σε μείωση της κινητικότητας του ιχνηθέτη παρουσία του βιομορίου.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.** Χρόνος ιδιοπεριστροφής ( $\tau_R$ ) και παράμετρος  $S$  των νανογαλακτωμάτων (α) άδειο (b) γεμάτο με ενσωματωμένη Βιταμίνη D στο ελαιόλαδο (c) γεμάτο με εξατμισμένη αιθανόλη

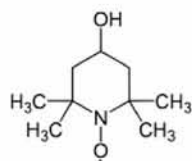
	Άδειο	Γεμάτο με ενσωματωμένη Βιταμίνη D στο ελαιόλαδο	Γεμάτο με εξατμισμένη αιθανόλη
$\tau_R$ (ns)	4.52±0.35	4.88±0.28	4.88±0.35
$S$	0.21±0.02	0.24±0.02	0.23±0.03

Συμπερασματικά, οι μετρήσεις EPR δείχνουν την επιτυχή ενθυλάκωση της Βιταμίνης D στα νανοσταγονίδια ελαίου, παρουσιάζοντας μια αξιοσημείωτη επίδραση της ενθυλακωμένης Βιταμίνης D στη δυναμική της μεμβράνης. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γνωρίζουμε τη ρευστότητα της μονοστοιβάδας του επιφανειοενεργού, καθώς μπορεί να έχει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα αποδέσμευσης των βιοενεργών ουσιών από τα συστήματα φορείς.

## 5.2 Αντιοξειδωτική μελέτη EPR

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των νανογαλακτωμάτων που αναπτύχθηκαν, η οποία προκύπτει τόσο από το ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών, όσο και από την ενθυλακωμένη Βιταμίνη D, μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία EPR με χρήση της ελεύθερης ρίζας TEMPOL (**EIKONA 19**). Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα μορίων με αντιοξειδωτική δράση να αντιδρούν με σταθερές ελεύθερες ρίζες και να μειώνουν το EPR σήμα τους. Το TEMPOL, είναι μία σταθερή ρίζα που

χαρακτηρίζεται από ένα ευδιάκριτο φάσμα τριών κορυφών.



[ ΕΙΚΟΝΑ 19. Χημική δομή TEMPOL ]

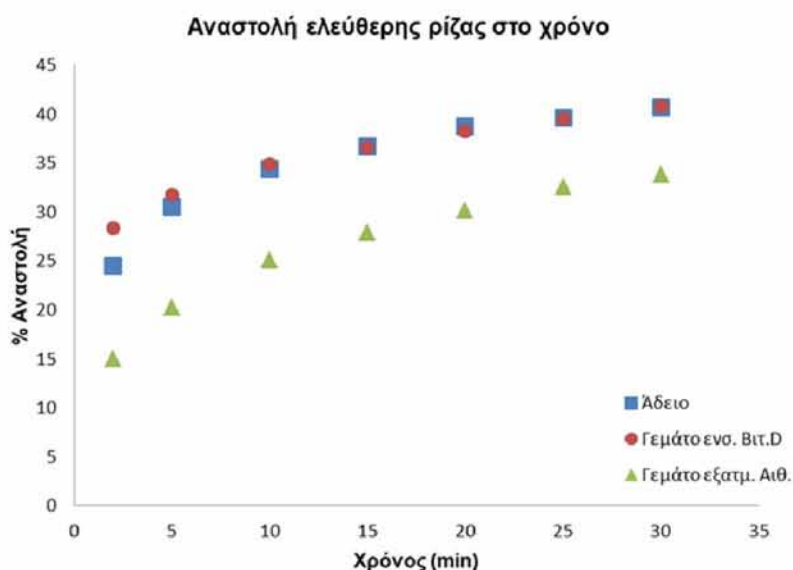
Οι αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχονται στα νανογαλακτώματα της παρούσας μελέτης εξουδετερώνουν την πιο πάνω ρίζα σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αναστολής ελεύθερων ριζών, το οποίο παρουσιάζεται σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία και απουσία Βιταμίνης D στο Διάγραμμα 3, ενώ στον Πίνακα 5 φαίνεται το τελικό ποσοστό σε χρόνο 30 min.

[ ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Ποσοστό αναστολής της ελεύθερης ρίζας TEMPOL σε χρόνο 30 min ]

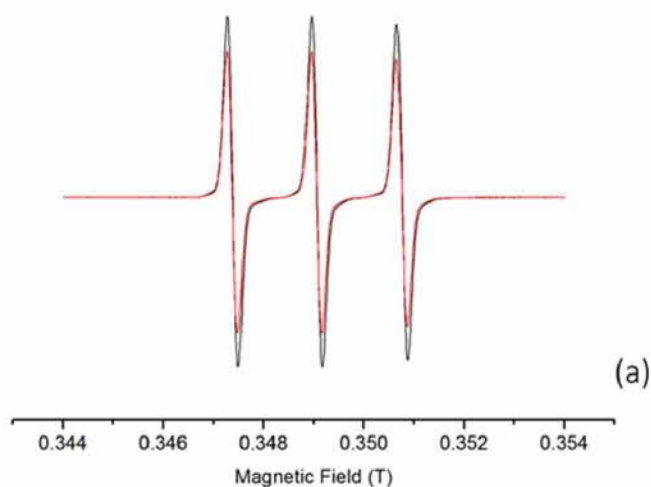
	Άδειο	Γεμάτο με ενσωματωμένη Βιταμίνη D στο ελαιόλαδο	Γεμάτο με εξατμισμένη αιθανόλη
% Αναστολή ελεύθερης ρίζας TEMPOL σε χρόνο 30 min	32.4	33.0	33.1



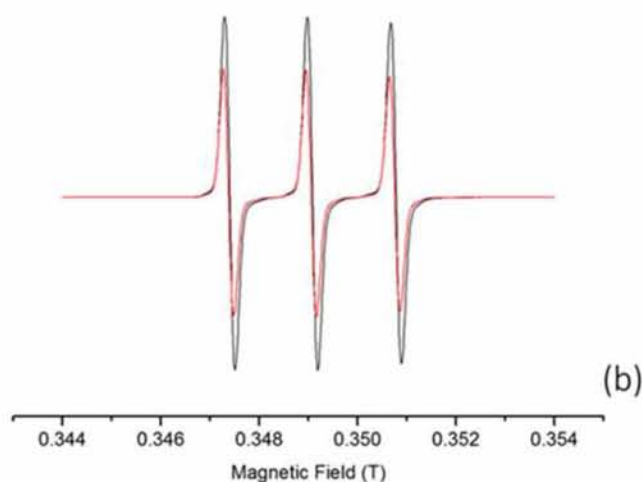
[ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3. Επίδραση του χρόνου στο ποσοστό αναστολής της ελεύθερης ρίζας TEMPOL ]

Πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος σε χρόνο  $t_0 = 2\text{min}$  και οι μετρήσεις

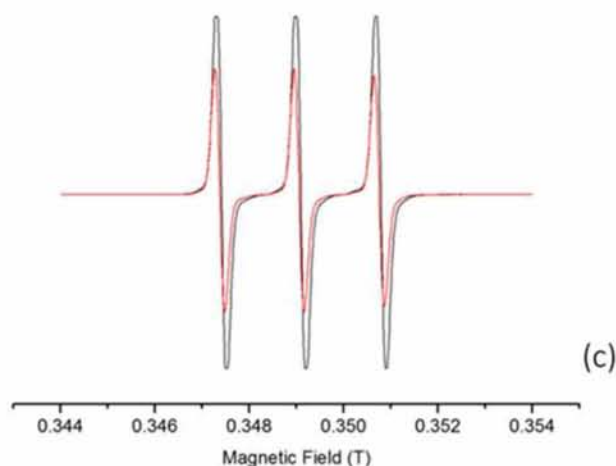
συνεχίστηκαν ανά 5 min για χρονικό διάστημα 30 min. Όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 3, το ποσοστό αναστολής αυξάνεται κατά τα πρώτα 10 min και στη συνέχεια τείνει να σταθεροποιηθεί. Η συνολική αντιοξειδωτική δραστηριότητα των συστημάτων που μελετήθηκαν προσδιορίστηκε με βάση τη μέτρηση της ολικής έντασης (integral intensity) της σταθερής ρίζας Tempol, η οποία μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής της με τα αντιοξειδωτικά, όπως φαίνεται στα διαγράμματα της **Εικόνας 20(a,b,c)**, στα οποία η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν το φάσμα της ελεύθερης ρίζας TEMPOL απουσία και παρουσία νανογαλακτώματος, αντίστοιχα.



**ΕΙΚΟΝΑ 20(a).** Φάσμα EPR της ελεύθερης ρίζας TEMPOL στο άδειο νανογαλάκτωμα



**ΕΙΚΟΝΑ 20(b).** Φάσμα EPR της ελεύθερης ρίζας TEMPOL στο γεμάτο νανογαλάκτωμα με ενσωματωμένη Βιταμίνη D στο ελαιόλαδο



***ΕΙΚΟΝΑ 20(c).** Φάσμα EPR της ελεύθερης ρίζας TEMPOL στο γεμάτο νανογαλάκτωμα με εξατμισμένη αιθανόλη*

Από τα πειραματικά δεδομένα διαπιστώνεται ότι και στις τρεις περιπτώσεις, τόσο το άδειο, όσο και τα γεμάτα νανογαλακτώματα, παρουσίασαν αντιοξειδωτική ικανότητα αφενός λόγω της υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου και αφετέρου λόγω της παρουσία της βιταμίνης D3 στη διάσπαρτη λιπαρή φάση. Η αναστολή του σήματος της ελεύθερης ρίζας ήταν 32.4 % για το άδειο σύστημα και 33.0 % και 33.1 % αντίστοιχα για τα δύο γεμάτα. Η παρατηρούμενη μικρή αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα γεμάτα συστήματα οφείλεται πιθανότατα στην παρουσία της βιταμίνης.

## 6. ΧΡΗΜΑΤΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟ ΠΛΑΝΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Το νανογαλάκτωμα με σύσταση 92% κ.β. υδατική φάση, 4% κ.β. ελαιόλαδο, 2% κ.β. λεκιθίνη, 2% κ.β. Tween 20, που αναπτύχθηκε για την ενθυλάκωση της Βιταμίνης D, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής καθώς περιέχει πολλά συστατικά τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας. Καθώς στην Ελλάδα υπάρχουν ορισμένες εταιρίες στον κλάδο των συμπληρωμάτων διατροφής που παράγουν προϊόντα βασισμένα στο ελαιόλαδο (Cretan IAMA, Intermed-Olivo Med), το σύστημα που παρασκευάστηκε μπορεί να ενσωματωθεί ως νέο προϊόν στην παραγωγική διαδικασία μίας υπάρχουσας εταιρίας.

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η εταιρία θα παρουσιάσει κέρδος από την



ενσωμάτωση του προτεινόμενου νανογαλάκτωμας στην γραμμή παραγωγής, είναι απαραίτητη μία μελέτη σκοπιμότητας η οποία πραγματοποιείται στα αρχικά στάδια οποιουδήποτε επιχειρηματικού έργου ή επένδυσης. Για τον σκοπό αυτό, γίνεται ανάλυση της αγοράς και του ανταγωνισμού, όπως επίσης και εκτίμηση του είδους και του ποσού των απαιτούμενων πόρων και του κόστους επένδυσης έτσι ώστε να ελεγχθεί η εφαρμοσιμότητα του προτεινόμενου έργου. Η προμελέτη σκοπιμότητας είναι η περιγραφή της επιχειρηματικής ιδέας με στοιχεία που αφορούν τις παραμέτρους που πρέπει να ληφθούν υπόψη στη μελέτη σκοπιμότητας που θα ακολουθήσει (Καρβούνης, 2006).

Για την παραγματοποίηση της μελέτης σκοπιμότητας που θα ακολουθήσει και για να γίνουν εφικτοί οι απαραίτητοι υπολογισμοί, έχουν ληφθεί υπόψη ορισμένες παραδοχές. Αρχικά, το νανογαλάκτωμα με την ενθυλακωμένη Βιταμίνη D προορίζεται για χρήση ως συμπλήρωμα διατροφής σε υγρή μορφή. Την ανάπτυξη του προϊόντος, περιλαμβανομένης της νανοενθυλάκωσης και την συσκευασία του τελικού προϊόντος θα αναλάβει υπάρχουσα εταιρία παραγωγής συμπληρωμάτων διατροφής. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται συνοπτικά το κόστος επένδυσης, λαμβάνοντας υπόψη τους παράγοντες που αναλύονται στις παρακάτω παραγράφους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Ανάλυση κόστους επένδυσης**

Είδος	Κόστος (€)
Μηχανήματα	26.550
Εξοπλισμός χημείου	3.000
Πρώτες ύλες	30.201
Διαμόρφωση χώρου	5.000
Έπιπλα-Λοιπός Εξοπλισμός	5.000
Έκτακτες δαπάνες	5.000
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>74.701</b>

## 6.1 Παραγωγή του προϊόντος

### 6.1.1 Εξοπλισμός

Καθώς το προτεινόμενο προϊόν πρόκειται να παραχθεί από ήδη υπάρχουσα εταιρία, η παραγωγή, η συσκευασία, η αποθήκευση και η διανομή των σκευασμάτων

είναι στάδια για τα οποία θεωρείται ότι διαθέτει τα κατάλληλα μέσα και οι εγκαταστάσεις είναι άμεσα διαθέσιμες. Ο απαιτούμενος εξοπλισμός της νέας γραμμής παραγωγής που θα δημιουργηθεί για το σκεύασμα αφορά κυρίως στην διαδικασία παραγωγής του νανογαλακτώματος και περιλαμβάνει συσκευή ανάδευσης (μίξερ) βιομηχανικής κλίμακας (>100L) συνδεδεμένο με σύστημα θερμοστάτησης για τον διαρκή έλεγχο της θερμοκρασίας του αναδευόμενου συστήματος καθώς και ομογενοποιητή υψηλής πίεσης βιομηχανικής κλίμακας για την ενθυλάκωση της βιταμίνης (βλ. Ενότητα «Κόστη εξοπλισμού και Λειτουργικά έξοδα», Παράρτημα II). Επιπλέον, θα χρειαστούν χώροι ψύξης για την φύλαξη των πρώτων υλών. Βασικής σημασίας είναι, η νέα γραμμή παραγωγής να εγκατασταθεί σε σημείο το οποίο θα διαθέτει εύκολη πρόσβαση στις πρώτες ύλες αλλά και θα είναι κοντά στο χώρο αποθήκευσης.

### **6.1.2 Πρώτες ύλες**

Οι πρώτες ύλες που απαιτούνται για την παρασκευή του νεού σκευάσματος είναι το βιολογικό έξτρα παρθένο ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης πολυφαινόλων Myrolion, απιονισμένο νερό, Βιταμίνη D σε σκόνη, άλας κιτρικού ασβεστίου, λεκιθίνη σόγιας και Tween 20 καθαρότητας κατάλληλης για τρόφιμα (food grade). Το ελαιόλαδο, το κιτρικό ασβέστιο και το Tween 20 διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, κατά προτίμηση σε σκιερό μέρος ενώ η Βιταμίνη D και η λεκιθίνη απαιτούν φύλαξη σε συνθήκες κατάψυξης ( $\theta < 0^{\circ}\text{C}$ ). Το τελικό προϊόν διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για τον έλεγχο της επιτυχούς ενθυλάκωσης θα γίνει χρήση του εξοπλισμού του χημείου της εταιρίας και θα πραγματοποιηθεί συνεργασία με εξωτερικούς συνεργάτες (υπεργολαβία) όταν κρίνεται απαραίτητο.

### **6.1.3 Ανθρώπινο δυναμικό**

Αρχικά, θα υπάρξει μία δοκιμαστική περίοδος του προϊόντος, κατά την οποία η παραγωγή θα λαμβάνει χώρα σε πενήνήμερη βάση ανά εβδομάδα και κάθε ημέρα θα πραγματοποιείται μία οκτάωρη βάρδια. Κατά τη διαδικασία παραγωγής το απαραίτητο προσωπικό το οποίο θα πρέπει να προσληφθεί από την εταιρία, περιλαμβάνει ένα εξειδικευμένο άτομο (τεχνολόγος τροφίμων/χημικό) και άλλον έναν υπάλληλο ως βοηθητικό προσωπικό. Το κόστος για την εταιρία, όσον αφορά στους δύο αυτούς υπαλλήλους, θα ανέρχεται στα 2300€ μηνιαία εκ των οποίων τα 1300€



αντιστοιχούν στον εξειδικευμένο υπάλληλο και 1000€ στον βοηθητικό (βλ. Ενότητα «Κόστη εξοπλισμού και Λειτουργικά έξοδα», Παράρτημα II). Τέλος, αμέσως μετά την παρασκευή, το προϊόν μετά θα παραδίδεται στο τμήμα που διαχειρίζεται την συσκευασία και την τυποποίησή του και το οποίο είναι ήδη επανδρωμένο.

#### **6.1.4 Λειτουργικά κόστη**

Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο υπολογισμός των λειτουργικών εξόδων τα οποία αποτελούν ένα σταθερό κόστος της εταιρίας ανά έτος και αφορούν τη συντήρηση μηχανημάτων, την συνεργασία με εξωτερικούς συνεργάτες για τον έλεγχο της ενθυλάκωσης της Βιταμίνης D, τη θέρμανση του χώρου στον οποίο θα γίνεται η παραγωγή, την ηλεκτρική ενέργεια που απαιτείται, τον καθαρισμό του χώρου παραγωγής και άλλα τυχόν έκτακτα έξοδα – λοιπές δαπάνες ανά έτος λειτουργίας. Επίσης συμπεριλαμβάνεται το κόστος της συσκευασίας του προϊόντος για την εμφιάλωση και μεταφορά στα σημεία διανομής, καθώς και για τις ενέργειες προβολής και προώθησης του προϊόντος (βλ. Ενότητα «Κόστη εξοπλισμού και Λειτουργικά έξοδα», Παράρτημα II).

#### **6.1.5 Κεφάλαιο κίνησης**

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο υπολογισμός του απαραίτητου κεφαλαίου κίνησης προσδιορίστηκαν τα κόστη που αφορούν τη διαχείριση και αποθήκευση των πρώτων υλών και επίσης έγινε εκτίμηση του περιθωρίου πίστωσης από προμηθευτές στην εταιρία για την αγορά πρώτων υλών (βλ. Ενότητα «Κεφάλαιο κίνησης και Έσοδα», Παράρτημα IV). Εφόσον, θεωρείται ότι το προϊόν θα παράγεται και θα διανέμεται κατά παραγγελία, προκειμένου να παραδίδεται φρέσκο και να διατηρεί την λειτουργικότητα των βιοδραστικών ουσιών που περιέχει, η εταιρία δεν θα διαθέτει απόθεμα του προϊόντος, ούτε θα παρέχει πίστωση στους πελάτες. Το αρχικό κεφάλαιο για την αγορά των πρώτων υλών προκειμένου να καλυφθεί η παραγωγή για τους τρεις πρώτους μήνες παρέχεται μέσω δανειοδότησης (Δάνειο 2) και στη συνέχεια επανατροφοδοτείται μέσω της εισροής των προβλεπόμενων εσόδων και του χρηματικού αποθεματικού που δημιουργείται (βλ. Ενότητες «Κεφάλαιο κίνησης και Έσοδα» και «Λογαριασμοί Εκμετάλλευσης», Παράρτημα IV, VI).

## 6.2 Ανταγωνισμός

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω στο Κεφάλαιο 2.3.1 στην ελληνική αγορά υπάρχει πληθώρα συμπληρωμάτων διατροφής για την πρόσληψη της Βιταμίνης D, πολλά από τα οποία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6** (βλ. Ενότητα «Πίνακες», Παράρτημα Ι), όπου κατηγοριοποιούνται με βάση την εταιρία παραγωγής, την δοσολογία και την μορφή τους.

## 6.3 Σχέδιο Marketing

Καθώς το προτεινόμενο σκεύασμα θα ενσωματωθεί στην παραγωγική διαδικασία μίας ήδη υπάρχουσας εταιρίας, πραγματοποιείται η παραδοχή ότι το σχέδιο marketing θα το αναλάβει αυτή, εφόσον ήδη διαθέτει κανάλια προώθησης και προβολής όπως επίσης κανάλια διανομής και πώλησης των προϊόντων της. Ωστόσο, στο Κεφάλαιο αυτό, προτείνονται ορισμένες στρατηγικές που θεωρούνται σωστές πρακτικές για το συγκεκριμένο νέο προϊόν.

### Τοποθέτηση

Η τοποθέτηση του προϊόντος στην αγορά, όπως και το κοινό το οποίο στοχεύει να προσελκύσει, έχουν σημαντικό ρόλο για τον σχεδιασμό της στρατηγικής του marketing και για την κατάλληλη προώθηση.

Το συγκεκριμένο σκεύασμα απευθύνεται σε καταναλωτές οι οποίοι έχουν υψηλές απαιτήσεις από τα προϊόντα τα οποία καταναλώνουν και επιθυμούν να λαμβάνουν το μέγιστο των ιδιοτήτων τους. Αφορά κυρίως άτομα τα οποία στοχεύουν στην αντιμετώπιση ανεπάρκειας Βιταμίνης D και στην διατήρηση ενός υγιούς σκελετού, μέσω της λήψης συμπληρωμάτων βασισμένων σε φυσικά και ασφαλή (GRAS) συστατικά. Το καινοτόμο αυτό προϊόν με την αυξημένη αποτελεσματικότητα που παρουσιάζει λόγω του συνδυασμού των συστατικών τα οποία εμφανίζουν συνεργιστικές δράσεις, αλλά και της παρασκευής του με χρήση νανοενθυλάκωσης, βοηθάει παράλληλα στη μείωση των τριγλυκεριδίων, καθώς το βιολογικό εξτρα παρθένο ελαιόλαδο που περιέχει υψηλή συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων.

Σε αντίθεση με τους ανταγωνιστές, το προτεινόμενο προϊόν συνδιάζει την

Βιταμίνη D αλλά και το Ασβέστιο σε ποσότητες ώστε με την λήψη του να καλύπτεται η ημερήσια συνιστώμενη δόση και για τις δύο αυτές ουσίες και ταυτόχρονα να επωφελείται ο καταναλωτής από τις ευεργετικές ιδιότητες του περιεχόμενου ελαιολάδου. Για τους λόγους αυτούς, το προτεινόμενο σκεύασμα αναφέρεται σε καταναλωτές που ενδιαφέρονται για καινοτόμα, υψηλής ποιότητας προϊόντα με ολοκληρωμένη δράση και θέλουν με χρήση ενός μόνο σκευάσματος να επιτύχουν το κατάλληλο αποτέλεσμα και τη μέγιστη δραστητικότητα των βιοδραστικών ουσιών.

### Τιμολόγηση

Όσον αφορά την τιμολογιακή πολιτική, θα βασιστεί στη διαφοροποίηση του νέου προϊόντος σε σχέση με τα υπάρχοντα, τόσο από άποψη υψηλής ποιότητας, αποτελεσματικότητας και συστατικών, όσο και από άποψη τεχνολογίας. Ωστόσο, προτείνεται τουλάχιστον η αρχική τιμή να έχει ως κύρια προτεραιότητα την προσέγγιση του καταναλωτικού κοινού και όχι την άμεση μεγιστοποίηση του κέρδους και για το λόγο αυτό στόχος είναι η τιμή πώλησης να μην είναι ιδιαίτερα υψηλή. Προκειμένου η τιμή να ανταποκρίνεται σε αυτή η απαίτηση αλλά να είναι ικανή να καλύψει και το μοναδιαίο κόστος παραγωγής, πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 9.30-9.50€ ανά μπουκάλι των 250mL, η οποία θεωρείται και ανταγωνιστική σε σχέση με τα υπάρχοντα προϊόντα, ειδικά για τη διαφοροποίηση που προσφέρει λόγω της νανοενθυλάκωσης και των περιεχόμενων συστατικών. Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 7) παρουσιάζεται ενδεικτικά το κόστος των πρώτων υλών και του προϊόντος, μετά από έρευνα που πραγματοποιήθηκε για πιθανούς προμηθευτές. Ωστόσο, είναι φανερό ότι οι τιμές αυτές δεν είναι οριστικές καθώς η εταιρία διαθέτει ήδη προμηθευτές που πιθανά να μπορούν να παρέχουν αυτές τις πρώτες ύλες σε καλύτερες τιμές και επιπλέον, η αναζήτηση νέων προμηθευτών θα γίνει με συγκεκριμένα κριτήρια και η συμφωνία που θα επιτευχθεί θα διαμορφωθεί με βάση τις ανάγκες και τις απαιτήσεις της εταιρίας που θα παράγει το σκεύασμα.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Κόστος ανά κιλό πρώτων υλών και προϊόντος**

Είδος	Κόστος πρώτης ύλης (€)	Κόστος πρώτης ύλης/Προϊόν (€)
Myrolion/ 1L	4,00	0,03600
Λεκιθίνη Σόγιας/ 250g	62,50	0,25000
Tween 20/ Kg	72,50	0,72500
Κιτρικό Ασβέστιο/ Kg	54,30	0,00109
Βιταμίνη D/ 5g	110,00	0,00001
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>303,30</b>	<b>1,02300</b>

## Κανάλια προώθησης και προβολής του προϊόντος

Στις μέρες μας, υπάρχει πληθώρα συμπληρωμάτων διατροφής στην αγορά για την κάλυψη όλων των αναγκών του καταναλωτικού κοινού, ωστόσο η έννοια της νανοτεχνολογίας δεν είναι ακόμα ευρέως διαδεδομένη. Επομένως είναι σαφές ότι για την επιτυχία του νέου προϊόντος που προτείνουμε είναι καθοριστικής σημασίας η κατάλληλη προβολή και προώθηση, η οποία θα πρέπει να συνδυαστεί με εκπαίδευση και ενημέρωση των καταναλωτών σχετικά με τα οφέλη του προϊόντος και την τεχνολογία πίσω από την παρασκευή του.

Κρίνεται απαραίτητο ο κύριος στόχος των ενεργειών για την προβολή και προώθηση του προϊόντος να είναι αποδοχή του από το κοινό, μέσω της εξοικείωσης του με αυτό, ώστε να μεταβεί από την κατανάλωση του παραδοσιακού προϊόντος, στο νέο εξελιγμένο προϊόν. Για το λόγο αυτό, η στρατηγική του content marketing θεωρείται ως η πλέον κατάλληλη να εφαρμοστεί. Προκειμένου αυτό να επιτευχθεί, η εταιρία θα χρησιμοποιήσει τόσο τα social media, όσο και την δική της ιστοσελίδα και την ιστοσελίδα του περιεχόμενου ελαιολάδου Myrolion, για την παροχή σημαντικών πληροφοριών, με σκοπό την ενημέρωση του κοινού. Επιπλέον, μέσω των social media και των ιστοσελίδων, στόχος είναι η εδραίωση μίας συνεχούς επικοινωνίας με τον καταναλωτή ο οποίος θα μπορεί να εκφράσει απορίες σχετικά με την νέα τεχνολογία του προϊόντος και να ενημερωθεί σε πιο προσωπικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, στον επίσημο ιστότοπο της εταιρίας θα παρέχονται συγκεντρωμένες όλες οι απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με το νέο προϊόν, με εύκολη και γρήγορη πρόσβαση, προσφέροντας αναλυτική ενημέρωση σχετικά με τις πρώτες ύλες, τη τεχνολογία που έχει χρησιμοποιηθεί καθώς και επιστημονικές έρευνες και άρθρα σχετικά με τις ευεργετικές ιδιότητες του σκευάσματος.

Επίσης προτείνεται η δωρεάν διάθεση δειγμάτων μέσω της επίσημης ιστοσελίδας της εταιρίας, αλλά και μέσω της ιστοσελίδας του ελαιολάδου Myrolion. Επιπλέον, την προβολή και προώθηση του προϊόντος, θα ενισχύσει η συμμετοχή της εταιρίας σε συνέδρια αλλά και σε εκθέσεις και ενημερωτικές καμπάνιες εντός των καταστημάτων (φαρμακείων), στις οποίες επίσης θα μπορεί να διαθέτει δωρεάν δείγματα με στόχο να οι καταναλωτές να γνωρίσουν το προϊόν και να προσελκύσει το ενδιαφέρον τους αναγνωρίζοντας τα οφέλη του έναντι των ανταγωνιστών ώστε να εδραιωθεί η δημιουργία σχέσης εμπιστοσύνης που θα οδηγήσει στην συνεχή επιλογή του.

## Κανάλια διανομής- πώλησης

Βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη σχέσης προϊόντος-πελάτη είναι να υπάρχουν τα κατάλληλα σημεία διανομής και πώλησης ώστε το προϊόν να είναι εύκολα διαθέσιμο. Η εφαρμογή ενός επιτυχημένου σχεδίου πώλησης εξασφαλίζει ότι θα καλυφθούν οι ανάγκες και απαιτήσεις των καταναλωτών χτίζοντας μια σχέση εμπιστοσύνης και θετικής στάσης. Καθώς το προτεινόμενο σκεύασμα θα ενσωματωθεί στην σειρά προϊόντων μιας ήδη υπάρχουσας εταιρίας, θεωρείται ότι θα χρησιμοποιηθούν τα κανάλια διανομής και πώλησης που διαθέτει τα οποία περιλαμβάνουν χονδρική πώληση σε φαρμακεία και συνεργασία με έμπειρους αντιπροσώπους. Ωστόσο, προτείνεται να διατείνεται και μία ολοκληρωμένη εφαρμογή e-shopping μέσω της επίσημης ιστοσελίδας της εταιρίας ή μέσω διαδικτυακών φαρμακείων, προκειμένου το προϊόν να είναι άμεσα διαθέσιμο σε όλους ανεξάρτητα από το πού βρίσκονται.

### **6.4 Προβλεπόμενα έσοδα**

Προκειμένου να γίνει εκτίμηση των προβλεπόμενων εσόδων γίνονται οι παραδοχές ότι η εταιρία θα συνεργάζεται με 40 φαρμακεία στην Ελλάδα, τα οποία θα πουλάνε κατά μέσο όρο 3 προϊόντα την ημέρα και ότι το e-shop θα πουλάει 2 συσκευασίες την ημέρα. Με βάση τα παραπάνω, τα προβλεπόμενα έσοδα από το νέο προϊόν κατά το πρώτο έτος παραγωγής, εκτιμώνται στα 159.685€ με τιμή πώλησης 9,30€/συσκευασία και με ρυθμό αύξησης εσόδων 2% το δεύτερο έτος, επιπλέον 3% το τρίτο έτος, 3,5% το τέταρτο και 4% το πέμπτο (βλ. Ενότητα «Κόστη εξοπλισμού και Λειτουργικά έξοδα» και «Λογαριασμοί εκμετάλλευσης» - Παράρτημα II,VI). Επιπλέον, μέσω της ανάλυσης νεκρού σημείου προσδιορίζεται η ποσότητα προϊόντος που πρέπει να πουληθεί προκειμένου η εταιρία να καλύπτει τόσο τα μεταβλητά, όσο και τα σταθερά έξοδα, χωρίς να παρουσιάζει ζημία, είναι δηλαδή το σημείο όπου τα έσοδα ισούνται με τα έξοδα και αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την εκτίμηση της βιωσιμότητας της επιχείρησης. Μέσω του Διαγράμματος ανάλυσης νεκρού σημείου (βλ. Ενότητα «Ανάλυση νεκρού σημείου»- Παράρτημα VII), διαπιστώνεται ότι προκειμένου η εταιρία να καλύψει τα έξοδα απαιτείται η παραγωγή 16.677 παραγωγικών μονάδων του προϊόντος οι οποίες αντιστοιχούν σε έσοδα ύψους 90.217,43€, τα οποία όπως φαίνεται από τον Πίνακα των εσόδων (βλ. Ενότητα «Κεφάλαιο κίνησης και Έσοδα»-Παράρτημα IV) δημιουργούνται από τον πρώτο κιόλας χρόνο παραγωγής, επομένως η εταιρία είναι κερδοφόρα.



## 6.5 Ανάλυση SWOT

Η μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα να εμφανίζονται συγκεντρωμένα τόσο τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του ίδιου το προϊόντος (δυνατά σημεία-αδυναμίες), όσο και τα εμπόδια και οι προοπτικές που παρουσιάζονται όσον αφορά την είσοδο στην αγορά. Η σύνοψη αυτή είναι σημαντική για να κριθεί το κατά πόσο είναι συμφέρουσα η ενσωμάτωση του προτεινόμενου προϊόντος στην γραμμή παραγωγής μίας εταιρίας και επίσης για την πρόβλεψη πιθανών προβλημάτων (βλ. Ανάλυση SWOT- Παράρτημα Ι).

## 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την ανάπτυξη βιοσυμβατού, μη τοξικού νανογαλακτώματος για την ενθυλάκωση Βιταμίνης D, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής. Το σύστημα που αναπτύχθηκε αποτελείται από ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων, Tween 20 και λεκιθίνη ως επιφανειοενεργά τα οποία χαρακτηρίζονται ως γενικά ασφαλή (GRAS) από τη βιομηχανία τροφίμων και υδατικό διάλυμα κιτρικού ασβεστίου συγκέντρωσης 15μM. Στο νανογαλάκτωμα πραγματοποιήθηκε επιτυχής ενθυλάκωση Βιταμίνης D, συγκέντρωσης 5,1μM με χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων. Στην πρώτη, η Βιταμίνη D ενσωματώθηκε στη λιπαρή φάση και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση, ενώ στη δεύτερη παρασκευάστηκε διάλυμα stock της βιταμίνης σε αιθανόλη, ποσότητα του οποίου εισάχθηκε σε δοχείο στο οποίο στη συνέχεια προστέθηκε άδαιο νανογαλάκτωμα μετά την εξάτμιση της αιθανόλης προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ενθυλάκωση στη λιπαρή φάση.

Μετά την παρασκευή των τριών συστημάτων (άδαιο νανογαλάκτωμα, γεμάτο νανογαλάκτωμα με ενσωματωμένη βιταμίνη στο ελαιόλαδο και γεμάτο νανογαλάκτωμα με εξατμισμένη αιθανόλη), πραγματοποιήθηκε τόσο δομική, όσο και αντιοξειδωτική μελέτη των συστημάτων. Η δομική μελέτη έγινε για τον προσδιορισμό των δομικών χαρακτηριστικών και της συμπεριφοράς των νανογαλακτωμάτων στην πάροδο του χρόνου όπως επίσης και για τον έλεγχο της επιτυχούς ενθυλάκωσης της βιταμίνης. Αρχικά, μέσω μετρήσεων Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) βρέθηκε ότι η διάμετρος των νανοσταγόνων κυμαίνεται μεταξύ 220nm και 248nm απουσία και παρουσία βιταμίνης αντίστοιχα και παρατηρήθηκε ότι τα συστήματα διαθέτουν

μεγάλη ομοιογένεια καθώς ο δείκτης πολυδιασποράς δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές μεταξύ των συστημάτων. Μελέτη σταθερότητας των συστημάτων έδειξε τη διατήρηση του μεγέθους των νανοσταγονιδίων και της ομοιογένειας με την πάροδο του χρόνου. Συγκεκριμένα, όλα τα συστήματα παρέμειναν σταθερά για 18 ημέρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι απουσία ασβεστίου τα νανογαλακτώματα παρέμειναν σταθερά μέχρι και 90 ημέρες.

Στη συνέχεια, με χρήση της φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR), εξετάστηκε η επιτυχής ενθυλάκωση της βιταμίνης μετά τη λήψη και επεξεργασία των φασμάτων EPR του αμφίφιλου ιχνηθέτη spin 5-DSA. Η μελέτη αυτή έδειξε μεταβολές στις ιδιότητες της διεπιφάνειας που σχηματίζει η μονοστιβάδα του επιφανειοενεργού στα νανοσταγονίδια. Οι τιμές των παραμέτρων  $S$  και  $T_R$  οι οποίες είναι ενδεικτικές της ρευστότητας της μεσεπιφάνειας και του χρόνου ιδιοπεριστροφής του ιχνηθέτη spin, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ευελιξία της μεμβράνης μειώνεται παρουσία βιταμίνης, γεγονός που οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με τη στιβάδα των επιφανειοενεργών. Επιπλέον, η αύξηση του χρόνου ιδιοπεριστροφής  $T_R$  είναι ενδεικτική της μείωσης της κινητικότητας του ιχνηθέτη παρουσία της βιταμίνης. Τα παραπάνω στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ενθυλάκωση της βιταμίνης έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς, προκαλώντας αξιοσημείωτη επίδραση στη δυναμική της μεμβράνης.

Τέλος, διενεργήθηκε μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστημάτων, με μία φασματοσκοπική μέθοδο EPR που βασίζεται στη χρήση της ελεύθερης ρίζας TEMPOL, απουσία και παρουσία του βιοδραστικού μορίου. Η αντιοξειδωτική δράση προκύπτει από την παρουσία της βιταμίνης σε συνδιασμό με το περιεχόμενο ελαιόλαδο το οποίο διαθέτει υψηλή συγκέντρωση φαινολικών. Από τα πειραματικά δεδομένα, τα οποία εκφράστηκαν σε ποσοστό αναστολής ελευθέρων ριζών σε χρονικό διάστημα 30min, παρατηρήθηκε αντιοξειδωτική ικανότητα και στα τρία συστήματα, η οποία έφτασε έως και αναστολή του 33.1% της ελεύθερης ρίζας στα νανογαλακτώματα με την ενθυλακωμένη Βιταμίνη D.

Επιπλέον, την ανάπτυξη και μελέτη του νανογαλακτώματος ακολούθησε μία προμελέτη σκοπιμότητας προκειμένου να γίνει εκτίμηση της προοπτικής ενός νέου προϊόντος συμπληρώματος διατροφής καθώς τόσο λόγω των περιεχόμενων συστατικών, όσο και λόγω της τεχνολογίας πίσω από την παρασκευή του, θεωρήθηκε ότι θα μπορούσε να αποτελέσει ένα αρκετά ανταγωνιστικό προϊόν σε σχέση με τα υπάρχοντα.

Ορισμένα από τα συστατικά που περιέχονται στο μικρογαλάκτωμα, όπως η Βιταμίνη D και το ασβέστιο όπως επίσης και το ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών και η λεκιθίνη, είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Συγκεκριμένα ο συνδιασμός βιταμίνης D και ασβεστίου παίζει κρίσιμο ρόλο για τη διατήρηση ενός υγιούς σκελετού, την πρόληψη έναντι διάφορων τύπων καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων λόγω της συμμετοχής τους σε ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια (Michael F. Holick, 2006), (Micheal F Holick & Chen, 2008). Επιπλέον, το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου διαθέτει αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή ιδιότητα, καθώς επίσης αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία παρέχει προστασία έναντι ασθενειών που επάγονται από το οξειδωτικό στρές, όπως η στεφανιαία καρδιακή νόσος (CHD), ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις καθώς επίσης η γήρανση και οι επιπτώσεις της στον οργανισμό (Li et al., 2012), (Lönn et al., 2012), (Wang & Bennett, 2012).

Μετά από την ανάλυση αγοράς όσον αφορά τον κλάδο των συμπληρωμάτων διατροφής, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για ένα ιδιαίτερα αναπτυσσόμενο κλάδο με πολλές προοπτικές, αφού όλο και περισσότεροι καταναλωτές στρέφονται προς αυτά για την διατήρηση ενός υγιούς οργανισμού και την πρόληψη ασθενειών (Nicoletti, 2012). Ωστόσο, μετά από έρευνα του υφιστάμενου ανταγωνισμού, διαπιστώθηκε ότι εξαιτίας των μειονεκτημάτων που διαθέτουν τα υπάρχοντα συμπληρώματα διατροφής για βιταμίνη D, το νανογαλάκτωμα που αναπτύχθηκε είναι ικανό να καλύψει το κενό που υπάρχει στην αγορά για ένα σκεύασμα το οποίο θα διαθέτει ολοκληρωμένη δράση. Προτείνεται λοιπόν, η ανάπτυξη του νανογαλακτώματος ως νέο προϊόν το οποίο θα ενσωματωθεί στην παραγωγική διαδικασία μίας υπάρχουσας εταιρίας συμπληρωμάτων διατροφής.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πρόταση σχεδίου marketing στο οποίο περιγράφηκαν οι καταναλωτές τους οποίους στοχεύει να προσεγγίσει η εταιρία με το συγκεκριμένο προϊόν, όπως επίσης η τιμολόγηση που εκτιμήθηκε στα 9,30€/συσκευασία, τιμή αρκετά ανταγωνιστική λαμβάνοντας υπόψη την τεχνολογία του νανογαλακτώματος. Επίσης περιγράφηκαν οι προτεινόμενοι τρόποι προβολής και προώθησης του νέου προϊόντος και τα κανάλια διανομής του. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του κόστους παραγωγής του προτεινόμενου προϊόντος το οποίο συμπεριλαμβάνει κόστος προσωπικού, τα λειτουργικά κόστη, τα κόστη πρώτων υλών, καθώς και οι αποσβέσεις εξοπλισμού, ιδίας συμμετοχής και η αποπληρωμή των δανείων που θα καλύψουν το κόστος επένδυσης και έγιναν ορισμένες παραδοχές, ώστε να είναι εφικτοί οι υπολογισμοί του

απαραίτητου κεφαλαίου κίνησης και των αναμενόμενων εισροών και εκροών που θα αναμένει η εταιρία σε κάθε έτος. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα στοιχεία του χρηματοοικονομικού πλάνου και μετά την πραγματοποίηση ανάλυσης νεκρού σημείου η οποία βοηθάει στην εκτίμηση της βιωσιμότητας μίας εταιρίας, κρίνεται ότι η εταιρία που θα ενσωματώσει το προτεινόμενο νανογαλάκτωμα στην γραμμή παραγωγής της ως νέο προϊόν, θα παρουσιάσει κερδοφορία από το πρώτο κιάλας έτος παραγωγής.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14(1), 3–15. Elsevier
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238–IN27. Academic Press Inc. (London)
- Cassileth, B. R., Heitzer, M., & Wesa, K. (2009). The public health impact of herbs and nutritional supplements. *Pharmaceutical Biology*, 47(8), 761–767.
- Chatzidaki, M. D., Arik, N., Monteil, J., Papadimitriou, V., Leal-Calderon, F., & Xenakis, A. (2016). Microemulsion versus emulsion as effective carrier of hydroxytyrosol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 137, 146–151. Elsevier
- Chatzidaki, M. D., Mitsou, E., Yaghmur, A., Xenakis, A., & Papadimitriou, V. (2015). Formulation and characterization of food-grade microemulsions as carriers of natural phenolic antioxidants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 483, 130–136. Elsevier
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310–1316.
- Cordell, G. A. (2000). Biodiversity and drug discovery — a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, 55(6), 463–480.
- Dima, Ș., Dima, C., & Iordăchescu, G. (2015). Encapsulation of Functional Lipophilic Food and Drug Biocomponents. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 417–438.
- Erdal, M. S., Ozhan, G., Mat, M. C., Ozsoy, Y., & Gungor, S. (2016). Colloidal nanocarriers for the enhanced cutaneous delivery of naftifine: Characterization studies and in vitro and in vivo evaluations. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 1027–1037.
- Fanun, M., Papadimitriou, V., & Xenakis, A. (2011). Characterization of cephalexin loaded nonionic microemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 361(1), 115–121. Elsevier
- Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M. A. V., & Legrand, J. (2003). Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *Journal of Food Engineering*, 58(3), 227–238.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276–290. Elsevier
- Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P., & Ramirez-Tortosa, M. C. (2010). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to



- future clinical trials. *Nutrition Reviews*, 68(4), 191–206.
- Griffith, & H., O. (1976). Lipid spin labels in biological membrane. *Spin Labeling Theory and Applications*, 453–523. Academic Press.
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826–2841. Royal Society of Chemistry.
- Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C. M., & Nolla, J. (2008). Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 13(4), 245–251.
- Hassan, P. a, Rana, S., & Verma, G. (2015). Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 31(1), 3–12.
- Heath, T., Fraley, R., & Papahdjopoulos, D. (1980). Antibody targeting of liposomes: cell specificity obtained by conjugation of F(ab')<sub>2</sub> to vesicle surface. *Science*, 210(4469), 539–541.
- Hewavitharana, A. K., & Gomes, F. P. (2016). Cholecalciferol: Properties and Determination. *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., pp. 42–46). Elsevier.
- Holick, M. F. (2002). Vitamin D: The underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*, 9(1), 87–98.
- Holick, M. F. (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases , cancers , and cardiovascular disease 1 – 4, 80(August), 1678–1688.
- Holick, M. F. (2006). High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. *Mayo Clinic Proceedings*, 81(3), 353–373. Mayo Foundation for Medical Education and Research.
- Holick, M. F., & Chen, T. C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(4), 1080S–6S.
- Katouzian, I., & Jafari, S. M. (2016). Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends in Food Science and Technology*, 53, 34–48. Elsevier
- Kiberstis, Paula; Roberts, L. (2002). It ' s not just the genes. *Science*, 296(March), 2002.
- Kommareddi, N. S., O'Connor, K. C., & John, V. T. (1994). EPR characterizations of  $\alpha$ -chymotrypsin active site dynamics in reversed micelles at enhanced gas pressures and after subjection to clathrate formation conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(3), 215–224.

- Koroleva, M. Y., & Yurtov, E. V. (2012). Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*, 81(1), 21–43.
- Landete, J. M., Curiel, J. A., Rodríguez, H., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2008). Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry*, 107(1).
- LANGER, R., & FOLKMAN, J. (1976). Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*, 263(5580), 797–800.
- Li, L., Ishdorj, G., & Gibson, S. B. (2012). Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: Implications for cancer treatment. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(7), 1399–1410. Elsevier.
- Lönn, M. E., Dennis, J. M., & Stocker, R. (2012). Actions of antioxidants in the protection against atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4), 863–884.
- Martín-Peláez, S., Covas, M. I., Fitó, M., Kušar, A., & Pravst, I. (2013). Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), 760–771.
- Martínez, I., Wallace, G., Zhang, C., Legge, R., Benson, A. K., Carr, T. P., Moriyama, E. N., et al. (2009). Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4175–4184.
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719–1729.
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8), 109–124.
- Mitsou, E., Tavantzis, G., Sotiroudis, G., Ladikos, D., Xenakis, A., & Papadimitriou, V. (2016). Food grade water-in-oil microemulsions as replacement of oil phase to help process and stabilization of whipped cream. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 510, 69–76. Elsevier B.V.
- Narang, A. S., Delmarre, D., & Gao, D. (2007). Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 345(1–2), 9–25.
- Nicoletti, M. (2012). Nutraceuticals and botanicals: Overview and perspectives. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(SUPPL. 1), 2–6.
- Omar, S. H. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78(2), 133–154.
- Pardeike, J., Hommoss, A., & Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of*

*Pharmaceutics*, 366(1–2), 170–184.

Qian, C., & McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000–1008. Elsevier

Quintanilla-Carvajal, M. X., Camacho-Díaz, B. H., Meraz-Torres, L. S., Chanona-Pérez, J. J., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez-Aparicio, A., & Gutiérrez-López, G. F. (2010). Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing. *Food Engineering Reviews*, 2(1), 39–50.

Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., et al. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol*, 20(12), 522–531.

Ravi, T. P. U., & Padma, T. (2011). Nanoemulsions for drug delivery through different routes. *Research in Biotechnology*, 2(3), 1–13.

Reinwald, S., Weaver, C. M., & Kester, J. J. (2008). The Health Benefits of Calcium Citrate Malate: A Review of the Supporting Science. *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 54, pp. 219–346).

Rock, C. L. (2007). Multivitamin-multimineral supplements: Who uses them? *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 277–279.

Roco, M. C. (2007). National Nanotechnology Initiative - Past, Present, Future, 1–42.

Ross, A. C., Manson, J. E., Abrams, S. A., Aloia, J. F., Brannon, P. M., Clinton, S. K., Durazo-Arvizu, R. A., et al. (2011). The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(1), 53–58.

Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development - a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 17(10), 547–556.

Schuh, R. S., Bruxel, F., & Teixeira, H. F. (2014). Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. *Quimica Nova*, 37(7), 1193–1198.

Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., De Caterina, R., et al. (2012). Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527(2), 81–89. Elsevier

Shahidi, F. (2012). Nutraceuticals , Functional Foods and Dietary Supplements in Health and Disease. *Journal of Food & Drug Analysis*, 20(1), 226–230.

Shinoda, K., Shibata, Y., & Lindman, B. (1993). Interfacial Tensions for Lecithin Microemulsions Including the Effect of Surfactant and Polymer Addition. *Langmuir*,

9(5), 1254–1257.

Sotelo, A., Sousa, H., & Sanchez, M. (1995). Comparative study of the chemical composition of wild and cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 47(2), 93–100.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 303–318.

Theochari, I., Goulielmaki, M., Danino, D., Papadimitriou, V., Pintzas, A., & Xenakis, A. (2017). Drug nanocarriers for cancer chemotherapy based on microemulsions: The case of Vemurafenib analog PLX4720. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 350–356. Elsevier

Vázquez-Velasco, M., Esperanza Daz, L., Lucas, R., Gómez-Martínez, S., Bastida, S., Marcos, A., & Sánchez-Muniz, F. J. (2011). Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *British Journal of Nutrition*, 105(10), 1448–1452.

Wang, J. C., & Bennett, M. (2012). Aging and atherosclerosis: Mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circulation Research*, 111(2), 245–259.

Wooster, T. J., Golding, M., & Sanguansri, P. (2008). Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir*, 24(22), 12758–12765.

Yatvin, M., Kreutz, W., Horwitz, B., & Shinitzky, M. (1980). pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science*, 210(4475), 1253–1255.

Yukuyama, M. N., Ghisleni, D. D. M., Pinto, T. J. A., & Bou-Chacra, N. A. (2016). Nanoemulsion: Process selection and application in cosmetics - A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(1), 13–24.

Καρβούνης Σ., (2006), Μεθοδολογία, Τεχνικές και Θεωρία για Οικονομοτεχνικές Μελέτες, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Πίνακες

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.** Συνιστώμενες δοσολογίες Βιταμίνης D και Ασβεστίου σε κάθε στάδιο ζωής (Ross et al., 2011)

Life-stage group (age and gender)	Calcium		Vitamin D		
	RDA (mg/d) (intake that covers needs of ≥97.5% of population)	UL (mg/d) <sup>a</sup>	RDA (IU/d) (intake that covers needs of ≥97.5% of population)	Serum 25OHD level (ng/ml) (corresponding to the RDA) <sup>b</sup>	UL (IU/d) <sup>a</sup>
1–3 yr (M+F)	700	2500	600	20	2500
4–8 yr (M+F)	1000	2500	600	20	3000
9–13 yr (M+F)	1300	3000	600	20	4000
14–18 yr (M+F)	1300	3000	600	20	4000
19–30 yr (M+F)	1000	2500	600	20	4000
31–50 yr (M+F)	1000	2500	600	20	4000
51–70 yr (M)	1000	2000	600	20	4000
51–70 yr (F)	1200	2000	600	20	4000
71+ yr (M+F)	1200	2000	800	20	4000
Pregnant or lactating (F)					
14–18 yr	1300	3000	600	20	4000
19–50 yr	1000	2500	600	20	4000
Infants					
0–6 months (M+F)	200 <sup>c</sup>	1000	400 <sup>c</sup>	20	1000
6–12 months (M+F)	260 <sup>c</sup>	1500	400 <sup>c</sup>	20	1500

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.** Μηχανισμοί δράσης φαινολικών ενώσεων

Άμεση απομάκρυνση των ROS/RNS ή ενίσχυση της κυτταρικής αντιοξειδωτικής ικανότητας
Επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων
Αύξηση της δραστηριότητας των καρκινογόνων αποτοξινωτικών ενζύμων
Παρεμποδισμός σχηματισμού N-νιτροζαμινών
Τροποποίηση του μεταβολισμού των οιστρογόνων ή / και του παχέος εντέρου
Αυξημένη απόπτωση καρκινικών κυττάρων και/ή μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων
Επηρεάζουν τη μεθυλίωση του DNA και / ή διατηρούν την επισκευή του DNA
Διατήρηση της ακεραιότητας των ενδοκυτταρικών μητρών
Άλλοι μηχανισμοί

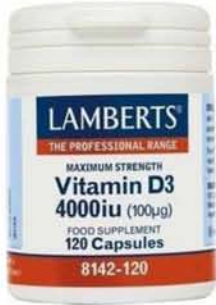







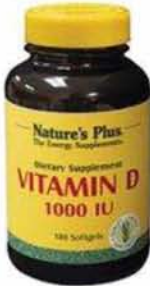


**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.** Φυσικοχημικές ιδιότητες Χοληκαλσιφερόλης ( $D_3$ ) και Εργοκαλσιφερόλης ( $D_2$ )

Properties	Ergocalciferol (vitamin $D_2$ )	Cholecalciferol (vitamin $D_3$ )
Molecular formula	$C_{28}H_{44}O$	$C_{27}H_{44}O$
Molar mass ( $g\ mol^{-1}$ )	396.63	384.62
Molar volume	$406.9\ cm^3\ mol^{-1}$	$396.9\ cm^3\ mol^{-1}$
Melting point ( $^{\circ}C$ )	115–118	84–85
pK <sub>a</sub>	14.74	14.74
log P	9.148	9.085
$\lambda_{max}$ (nm)	264.5	264.5
Extinction coefficient ( $E_{cm}^{1\%}$ (hexane))	459	485
Extinction coefficient ( $E_{cm}^{1\%}$ (ethanol))	462	485
Optical rotation (chloroform)	+52°	+52°
Mass solubility (water)	(Sparingly soluble ( $5.9E-5\ g\ l^{-1}$ ))	(Sparingly soluble ( $6.5E-5\ g\ l^{-1}$ ))
Molar solubility (water)	(Sparingly soluble ( $1.5E-7\ mol\ l^{-1}$ ))	(Sparingly soluble ( $1.7E-7\ mol\ l^{-1}$ ))

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.** Υπάρχοντα συμπληρώματα Βιταμίνης D- Ανταγωνισμός

Εταιρία	Εικόνα	Δοσολογία	Μορφή
BetterYou		D3 1000 I.U.	σπρέυ
		D3 3000 I.U.	
Eviol		D3 1200 I.U.	μαλακές κάψουλες
		D3 2200 I.U.	Μαλακές κάψουλες
		D3 4000 I.U.	Μαλακές κάψουλες
Health Aid		D3 1000 I.U.	Ταμπλέτες
		D3 5000 I.U.	Φυτικές κάψουλες

Lamberts		D3 280 I.U.	Μασώμενα δισκία
		D3 400 I.U.	Ταμπλέτες
		D3 1000 I.U.	κάψουλες
		D3 4000 I.U.	κάψουλες
Lanes		D3 1000 I.U.	ταμπλέτες
Life Extension		D3 1000 I.U.	Μαλακές κάψουλες
My Elements		D3 1000 I.U.	Αναβράζοντα δισκία
Natural Vitamins		D3 2000 I.U. + K2 7,5 µg	μασώμενες ταμπλέτες
		D3 1500 I.U.	ταμπλέτες

Natures Aid		D3 400 I.U.	Ταμπλέτες
		D3 1000 I.U.	Ταμπλέτες
		D3 2500 I.U.	Σταγόνες
		D3 5000 I.U.	ταμπλέτες
Nature's Plus		D3 1000 I.U. + K2 100 mcg	Φυτικές κάψουλες
		D3 400 I.U.	ταμπλέτες
		D3 1000 I.U.	Μαλακές κάψουλες. Μασώμενα δισκία
		D3 2500 I.U.	Μαλακές κάψουλες
		D3 5000 I.U.	Μαλακές κάψουλες
Now Foods		D3 1000 I.U.	Μαλακές κάψουλες
		D3 2000 I.U.	
		D3 5000 I.U.	
		D3 1000 I.U. + K2 45mcg	
		D3 1000 I.U. + K2 100 mcg	σπρέυ

Power Health		D3 1000 I.U.	ταμπλέτες
		D3 2000 I.U.	
		D3 5000 I.U.	
Solgar		D3 400 I.U.	μαλακές κάψουλες
		D3 600 I.U.	
		D3 1000 I.U.	Ταμπλέτες, μασώμενα δισκία
		D3 2200 I.U.	Κάψουλες
Uni-Pharma		D3 2500 I.U.	σταγόνες
Uni-Pharma		D3 1200 I.U.	ταμπλέτες
		D3 2000 I.U.	
		D3 4000 I.U.	
Uni-Pharma		D3 800 I.U. + Ca 500 mg	φακελάκια



ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ		ΔΥΝΑΤΑ ΣΗΜΕΙΑ	ΑΔΥΝΑΜΙΕΣ
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Φυσικές ή GRAS πρώτες ύλες</li> <li>Βασισμένο στο βιολογικό έξτρα παρθένο ελαιόλαδο υψηλής συγκέντρωσης πολυφαινολών (ισχυρισμός υγείας)</li> <li>Συνδιασμός Βιταμίνης D, Ασβεστίου και πολυφαινολών ελαιολάδου</li> <li>Βιοδραστικές ουσίες στις συνιστώμενες ημερήσιες δοσολογίες</li> <li>Αυξημένη ζήτηση από τους καταναλωτές για συμπληρώματα διατροφής</li> <li>Διαρκής ανάπτυξη του κλάδου των συμπληρωμάτων διατροφής</li> <li>Καινοτομία προϊόντος με ανταγωνιστικό πλεονέκτημα την χρήση νανοτεχνολογίας για την αύξηση της αποτελεσματικότητας</li> <li>Δεν απαιτούνται κλινικές δοκιμές</li> <li>Δεν απαιτείται συνταγογράφηση</li> <li>Ασφαλές και κατάλληλο ανεξάρτητα της ηλικίας</li> <li>Θα λανσαριστεί υπό brand name ήδη υπάρχουσας γνωστής εταιρίας</li> <li>Υπάρχοντα κανάλια προώθησης και πώλησης της συνεργαζόμενης εταιρίας</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ενδεχόμενο ρίσκο καθώς αποτελεί καινοτόμο προϊόν και νέο στον έλληνα καταναλωτή, ο οποίος δεν είναι εξοικειωμένος με την νανοτεχνολογία</li> <li>Κόστος που θα επωμιστεί η συνεργαζόμενη εταιρία όσον αφορά το νέο εξοπλισμό στην παραγωγή</li> <li>Απαιτείται προσοχή στις ποσότητες κατανάλωσης, καθώς υπερδοσολογία βιταμίνης D και Ασβεστίου πιθανά να ενέχει κινδύνους</li> <li>Το τελικό κόστος πιθανά να είναι υψηλότερο σε σχέση με κάποια από τα υπάρχοντα σκευάσματα</li> </ul>
ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ		ΕΥΚΑΙΡΙΕΣ	ΑΠΕΙΛΕΣ
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Στροφή καταναλωτών προς φυσικά προϊόντα</li> <li>Εκθετική αύξηση λήψης συμπληρωμάτων διατροφής από όλες τις ηλικιακές ομάδες</li> <li>Διαρκής τεχνολογική πρόοδος και βελτίωση νέων τεχνολογιών για παραγωγή αποτελεσματικών προϊόντων, όπως της νανοενθυλάκωσης</li> <li>Δυνατότητα ενθυλάκωσης διαφορετικών βιοδραστικών ουσιών για παραγωγή σειράς συμπληρωμάτων βασισμένων στο ελαιόλαδο, για κάλυψη πιο εξειδικευμένων αναγκών</li> <li>Δυνατότητα ύπαρξης βιοδραστικών ουσιών με διαφορετικές πολικότητες (λιπόφιλα και υδρόφιλα) στο ίδιο σκεύασμα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Οικονομική κρίση που πλήττει την Ελλάδα</li> <li>Μείωση της αγοραστικής δύναμης του καταναλωτή λόγω περιορισμένου εισοδήματος</li> <li>Αύξηση τιμών των πρώτων υλών από τους προμηθευτές</li> <li>Δυσπιστία ιατρικής κοινότητας</li> <li>Πιστοί καταναλωτές σε υπάρχοντα σκευάσματα</li> <li>Πιθανότητα αντιγραφής προϊόντος από άλλες εταιρίες</li> </ul>



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II- Κόστη εξοπλισμού και Λειτουργικά έξοδα

Έξοδα εγκατάστασης και εξοπλισμού	Κόστος (€)	Διάρκεια απόσβεσης (έτη)
Μηχανήματα	26.550	5
Εξοπλισμός χημείου	3.000	5
Διαμόρφωση χώρου	5.000	5
Έπιπλα-Λοιπός Εξοπλισμός	5.000	5
Έκτακτες δαπάνες	5.000	5
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>44.550</b>	

ΕΤΗΣΙΑ ΕΞΟΔΑ (€)	Κόστος (€)				
	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Έξοδα προσωπικού	32.200	32.200	33.166	34.161	35.869
Έξοδα λειτουργίας					
Θέρμανση	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600
ΔΕΗ	6.000	6.000	6.000	6.000	6.000
Καθαρισμός κτιρίων	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200
Συντήρηση Μηχανημάτων	1.500	1.500	2.500	1.500	1.500
Marketing	7.400	7.400	7.400	7.400	7.400
Υπεργολαβία	6.000	6.000	6.000	6.000	6.000
Κόστος Συσκευασίας	11.217	11.330	11.442	11.498	11.610
Πρώτες ύλες	30.201	30.504	30.806	30.957	31.259
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>99.319</b>	<b>99.733</b>	<b>102.113</b>	<b>102.316</b>	<b>104.438</b>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III- Δάνεια

Έξοδα εγκατάστασης και εξοπλισμού (σε €)	%	44.550
Ίδια συμμετοχή	40%	17.820
Δανειοδότηση	60%	26.730
	<b>Δάνειο 1</b>	<b>Δάνειο 2</b>
Ύψος Δανείων (€)	26.730	36.618
Ετήσιο επιτόκιο δανεισμού (%)	5.35%	5.35%
Διάρκεια Αποπληρωμής (έτη)	5	3
Έτος Έναρξης	0	0
Τοκοχρεωλύσιο (€)	6.234	13.535

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΠΛΗΡΩΜΗΣ ΔΑΝΕΙΟΥ 1	Έτος 0	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Τοκοχρεωλύσιο (Δόση) (€)		6.234	6.234	6.234	6.234	6.234
Χρεωλύσιο (€)		4.804	5.061	5.332	5.617	5.917
Τόκοι (€)		1.430	1.173	902	617	317
Υπόλοιπο Δανείου 1 (€)	26.730	21.926	16.865	11.534	5.917	0

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΠΟΠΛΗΡΩΜΗΣ ΔΑΝΕΙΟΥ 2	Έτος 0	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3
Τοκοχρεωλύσιο (Δόση) (€)		13.535	13.535	13.535
Χρεωλύσιο (€)		11.576	12.195	12.847
Τόκοι (€)		1.959	1.340	687
Υπόλοιπο Δανείου 2 (€)	36.618	25.042	12.847	0

#### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV- Κεφάλαιο κίνησης και Έσοδα

	Μέρες
Αποθήκευση Α' Υλών	90
Κάλυψη Ρευστότητας	365
Πίστωση σε πελάτες	0
Πίστωση σε προμηθευτές	60

Κόστη (€)	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Αποθέματα Α' Υλών	7.550	7.626	7.701	7.739	7.815
Πιστώσεις Προμηθευτών	6.903	6.972	7.041	7.076	7.145
Αναγκαίο Κεφάλαιο Κίνησης	24.829	24.933	25.528	25.578	26.109
Κάλυψη Ρευστότητας	45.349	78.760	109.078	151.642	191.018

Προϊόν	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Ρυθμός αύξησης εσόδων %		2,0%	3,0%	3,5%	4,0%
Έσοδα (€)	159.685	162.879	164.476	165.274	166.073



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V- Ταμειακές ροές

A. ΕΙΣΡΟΕΣ (€)	Έναρξη	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Έσοδα Προϊόντος Φαρμακείο		154.285	157.371	158.914	159.685	160.457
Έσοδα Προϊόντος E-shop		5.400	5.508	5.562	5.589	5.616
<b>Σύνολο Κύκλου Εργασιών</b>		<b>159.685</b>	<b>162.879</b>	<b>164.476</b>	<b>165.274</b>	<b>166.073</b>
Πλέον Πιστώσεις από Προμηθευτές		6.903	6.972	7.041	7.076	7.145
Ίδια Συμμετοχή	17.820					
Δάνεια	63.348					
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΕΙΣΡΟΩΝ</b>	<b>81.168</b>	<b>166.588</b>	<b>169.851</b>	<b>171.517</b>	<b>172.350</b>	<b>173.217</b>

B. ΕΚΡΟΕΣ (€)	Έναρξη	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
Δαπάνες επένδυσης	44.550					
Χρεωλύσια δανείων 1,2		16.379,4	17.255,7	18.178,9	5.616,7	5.917,2
Τόκοι δανείων 1,2		3.389,1	25.12,8	1.589,6	617,1	316,6
Δαπάνες για Α' Ύλεις		30.201,5	30.503,5	30.805,5	30.956,5	31.258,6
Δαπάνες Συσκευασίας		11.217,6	11.329,8	11.442,0	11.498,0	11.610,2
Δαπάνες Προσωπικού		32.200,0	32.200,0	33.166,0	34.161,0	35.869,0
Λειτουργικά Κόστη		25.700,0	25.700,0	26.700,0	25.700,0	25.700,0
Φόρος Εισοδήματος (29%)		13.939,6	14.999,8	15.040,3	15.495,3	15.198,5
Μερισματα		0,0	1.836,2	3.682,3	5.690,5	7.442,0
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΕΚΡΟΩΝ</b>	<b>44.550</b>	<b>13.3027,2</b>	<b>136.337,8</b>	<b>140.604,6</b>	<b>129.735,2</b>	<b>133.312,2</b>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI- Λογαριασμοί εκμετάλλευσης

	Έτος 1	Έτος 2	Έτος 3	Έτος 4	Έτος 5
<b>Σύνολο κύκλου εργασιών</b>	<b>159.685,71</b>	<b>162.879,43</b>	<b>164.476,29</b>	<b>165.274,71</b>	<b>166.073,14</b>
Μείον: Κόστος πωληθέντων	41.419,10	41.833,29	42.247,48	42.454,58	42.868,77
<b>Μικτό κέρδος εκμετάλλευσης</b>	<b>118.266,62</b>	<b>121.046,14</b>	<b>122.228,81</b>	<b>122.820,14</b>	<b>123.204,38</b>
Μείον: Έξοδα προσωπικού	32.200,00	32.200,00	33.166,00	34.160,98	35.869,03
Μείον: Έξοδα λειτουργίας	25.700,00	25.700,00	26.700,00	25.700,00	25.700,00
Αποτέλεσμα προ φόρων, τόκων και αποσβέσεων	60.366,62	63.146,14	62.362,81	62.959,16	61.635,35
Μείον: Τόκοι δανείων	3.389,12	2.512,82	1.589,64	617,07	316,57
Μείον: Αποσβέσεις	8.910,00	8.910,00	8.910,00	8.910,00	8.910,00
Αποτέλεσμα προ φόρων	48.067,50	51.723,32	51.863,17	53.432,09	52.408,77
Μείον: Φόρος εισοδήματος (29%)	13.939,57	14.999,76	15.040,32	15.495,31	15.198,54
<b>Καθαρό κέρδος</b>	<b>34.127,92</b>	<b>36.723,56</b>	<b>36.822,85</b>	<b>37.936,78</b>	<b>37.210,23</b>
Μέρισμα	0%	5%	10%	15%	20%
	0	1.836,18	3.682,28	5.690,52	7.442,04
<b>Αποθεματικό</b>	<b>34.127,92</b>	<b>34.887,38</b>	<b>33.140,56</b>	<b>32.246,27</b>	<b>29.768,18</b>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII- Ανάλυση νεκρού σημείου

	Παραγωγικές μονάδες	Σταθερό κόστος (€)	Μεταβλητό κόστος (€)	Έσοδα (€)
Έναρξη	0	66.810	66.810	0
Έτος 1	29.520	66.810	108.138	<b>159.685,7</b>
Έτος 5	30.700	66.810	109.791	<b>166.073,1</b>

